



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

SUELEN SIMÕES AMARAL

**MEMBRANAS POROSAS DE POLÍMEROS PLA E PCL:
estudo in vitro microbiológico e da osteogênese**

2018

SUELEN SIMÕES AMARAL

**MEMBRANAS POROSAS DE POLÍMEROS PLA E PCL:
estudo *in vitro* microbiológico e da osteogênese**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Amaral, Suelen Simões

Membranas porosas de polímeros de PLA e PCL: estudo in vitro microbiológico e da osteogênese / Suelen Simões Amaral. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

65 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Biomaterial. 2. Polímeros. 3. Biocompatibilidade. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Gabriela de Fátima Santana-Melo

São José dos Campos, 04 de Maio de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, por ser essencial em minha vida e permitir que tudo pudesse ser realizado.

À minha mãe, a minha fortaleza, **Rose Nastalli Simões Amaral**, pelo seu amor incondicional, pelo seu incentivo e por acreditar que conseguiria.

À minha irmã **Simone** e o seu esposo **Cleverson**, que de perto acompanharam e acreditaram em mim. Sou muito grata a vocês, pois durante toda esta longa jornada o incentivo para persistir e os bons conselhos foram essenciais.

À minha irmã **Solange** e o seu esposo **Guto**, por sempre torcerem, apoiarem e rezarem por mim.

Ao meu namorado **Vagner**, pelo carinho, incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, concedendo à sabedoria, a força, a coragem a cada dia para continuar e concluir essa grande conquista. Por colocar em meu caminho pessoas especiais que permitiram chegar até aqui.

À UNESP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, por todo apoio acadêmico durante o mestrado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira e vice-coordenador prof. Adj. Mauro Pedrine Santamaria.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal pelos ensinamentos transmitidos e aos secretários pela disponibilidade em me ajudar.

Agradeço aos técnicos, Sérgio Alves e Domingos Pontes, do laboratório de Microbiologia e Imunologia do ICT/Unesp, Campus de São José dos Campos, por todo auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado no período de 06/04/2016 a 04/05/2018.

À professora da Unifesp, Dra. Eliandra de Sousa Trichês e a pesquisadora Idália Aparecida Waltrick de Brito Siqueira, pelo fornecimento das amostras das membranas poliméricas testadas no experimento.

À professora da Univap, Dra. Cristina Pacheco Soares e a pesquisadora Dra. Maíra Maftoum Costa, pelo suporte durante a análise de micronúcleos.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pela disposição em ajudar, pelo apoio e a tranquilidade passada durante a conclusão do trabalho.

À Prof. Adj. Samira Esteves Afonso Camargo, pela paciência em ensinar e todas as dicas na execução deste trabalho.

À aluna de iniciação científica, Thalita Suelen Queiroz, por ter me ajudado sempre que necessário.

Aos professores titulares e suplentes da banca examinadora: Profa. Dra. Gabriela de Fátima Santana-Melo, Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira, Profa. Dra. Eliandra de Sousa Trichês, Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, Profa. Dra. Ritchelli Ricci e Profa. Adj. Ana Lia Anbinder.

Agradeço aos meus amigos de mestrado, Andresa Botan, Mariana Raquel e Lucas P. Ramos, pelo carinho, amizade e cumplicidade que ultrapassam os limites das salas de aula e dos laboratórios, são amizades para a vida toda.

Agradeço a todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pelo convívio, pela troca de experiências e conhecimentos. Desejo sucesso para todos.

**“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância,
mas a ilusão do conhecimento”.**

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Obtenção de membranas poliméricas com incorporação de fibras de silicato de cálcio	21
3.2 Grupos experimentais	22
3.3 Análises de biocompatibilidade	22
3.3.1 Cultivo celular	22
3.3.2 Citotoxicidade – Ensaio de Alamar Blue.....	24
3.3.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo	24
3.3.4 Conteúdo de Proteína Total	25
3.3.5 Atividade de Fosfatase Alcalina.....	27
3.3.6 Formação dos nódulos de mineralização.....	28
3.4 Avaliação da atividade bacteriana	29
3.4.1 Análise da ação antimicrobiana em cultura planctônica	29
3.4.2 Análise da redução bacteriana em biofilme monotípico de <i>Enterococcus faecalis</i>.....	30
3.4.2.1 Tratamento com o gluconato de clorexidina	32
3.4.2.2 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT	32
3.5 Análise estatística	33
4 RESULTADOS.....	34

4.1 Avaliação das membranas poliméricas por MEV	34
4.2 Ensaio de citotoxicidade	36
4.3 Ensaio de genotoxicidade	37
4.4 Conteúdo de Proteína Total	38
4.5 Atividade de Fosfatase Alcalina.....	39
4.6 Formação dos nódulos de mineralização	40
4.7 Análise da ação antimicrobiana em cultura planctônica.....	44
4.8 Atividade metabólica dos micro-organismos em biofilme após exposição à solução de gluconato de clorexidina pelo teste de MTT.....	45
5 DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57

Amaral SS. Membranas porosas de polímeros de PLA e PCL: estudo *in vitro* microbiológico e da osteogênese [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi analisar *in vitro* o comportamento de osteoblastos MG-63 em contato com membranas reabsorvíveis porosas de poli (ácido láctico) (PLA) e policaprolactona (PCL), incorporadas com fibras cerâmicas de silicato de cálcio (CaSiO_3), visando aplicação na regeneração óssea guiada. Foram utilizados seis grupos experimentais, a partir da concentração do teor de CaSiO_3 , PLA P; PLA + 5% CaSiO_3 ; PLA + 10% CaSiO_3 ; PCL P; PCL + 5% CaSiO_3 ; PCL + 10% CaSiO_3 , e o grupo controle. Foram avaliadas viabilidade celular, genotoxicidade; produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e formação matriz mineralizada. Bem como, a influência das membranas poliméricas na redução de biofilmes monotípicos de *Enterococcus faecalis* quando associadas ou não a solução de gluconato de clorexidina a 0,12%. Os dados foram analisados por ANOVA e Tukey ($p < 0.05$). Os resultados mostraram que nenhum grupo experimental foi citotóxico, mas os grupos PCL P, PLA 5%, PLA P e PCL 10% apresentaram maior viabilidade celular com diferença estatística dos grupos PCL 5% e PLA 10% ($p < 0.05$). No teste de genotoxicidade os grupos experimentais não foram genotóxicos, já que apresentaram números de micronúcleos semelhantes ou menores ao grupo controle ($p > 0.05$). Todos os grupos experimentais apresentaram proteína total e atividade de fosfatase alcalina semelhante estatisticamente ao controle ($p > 0.05$) e permitiram a formação de matriz mineralizada. Com relação à redução de biofilme, os grupos experimentais PCL P e PCL 10% apresentaram maior redução de biofilme para *Enterococcus faecalis* com diferença estatística ($p < 0.05$) do PCL 5% e do controle. Nos grupos experimentais de PLA, todas as membranas promoveram maior redução de biofilme com diferença estatística ($p < 0.05$) do grupo controle. Entretanto quando os grupos experimentais de PCL, bem como de PLA foram tratados com gluconato de clorexidina, observou-se redução do biofilme em todos os grupos, sem diferença estatística do grupo controle ($p > 0.05$). Concluiu-se que as membranas poliméricas são biomateriais adequados para o uso em regeneração óssea guiada. Da mesma maneira, pareceram contribuir para a osteogênese e redução de biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Palavras-chave: Biomaterial. Polímeros. Biocompatibilidade.

Amaral SS. Porous membranes of PLA and PCL polymers: in vitro microbiological study and osteogenesis [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the behavior of MG-63 osteoblasts in contact with poly (lactic acid) (PLA) and polycaprolactone (PCL) porous resorbable membranes, incorporated with calcium silicate ceramic fibers (CaSiO_3), aiming application in bone regeneration guided in periapical lesions. Six experimental groups were used, from the concentration of CaSiO_3 , PLA P; PLA + 5% CaSiO_3 ; PLA + 10% CaSiO_3 ; PCL P; PCL + 5% CaSiO_3 ; PCL + 10% CaSiO_3 , and the control group. Cell viability, genotoxicity; total protein production, alkaline phosphatase activity and mineralized matrix formation. As well as the influence of polymer membranes on the reduction of monotypic biofilms of Enterococcus faecalis when associated with 0.1% chlorhexidine gluconate solution. Data were analyzed by ANOVA and Tukey ($p < 0.05\%$). The results showed that no experimental group was cytotoxic, but the PCL P, PLA 5%, PLA P and PCL 10% groups presented higher cell viability with a statistical difference between PCL 5% and PLA 10% ($p < 0.05$). In the genotoxicity test, the experimental groups were not genotoxic, since they had similar or smaller numbers of micronuclei to the control group ($p > 0.05$). All experimental groups presented total protein and alkaline phosphatase activity statistically similar to the control ($p > 0.05$) and allowed the formation of mineralized matrix. Regarding the biofilm reduction, the PCL P and PCL 10% experimental groups showed a higher biofilm reduction for Enterococcus faecalis with a statistical difference ($p < 0.05$) in PCL 5% and control. In the PLA experimental groups, all membranes promoted a higher biofilm reduction with a statistical difference ($p < 0.05$) in the control group. However, when the PCL and PLA groups were treated with chlorhexidine gluconate, biofilm reduction was observed in all groups, with no statistical difference in the control group ($p > 0.05$). It was concluded that the polymer membranes are biomaterials suitable for use in guided bone regeneration. In the same way, they appeared to contribute to the osteogenesis and biofilm reduction of Enterococcus faecalis.

Keywords: Biomaterial. Polymers. Biocompatibility.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, pesquisas voltadas ao desenvolvimento de biomateriais estão em crescente evolução. A área de biomateriais é um campo com amplas perspectivas de crescimento futuro e apresenta uma diversidade de aplicações de interesse médico e odontológico. Particularmente na clínica odontológica, a utilização de biomateriais representa um potente instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas na presença de defeitos ósseos e lesões periapicais. (Cordas, 2006; Bugarin, Garrafa, 2007; Sheikh et al., 2015; Fernandes et al., 2017; Sladkova et al., 2017)

As lesões periapicais são as condições patológicas muito comuns envolvendo os dentes, afetando os tecidos perirradiculares. Sendo a infecção microbiana dos tecidos pulpar o principal responsável pelo início e progressão da periodontite apical (Veeramachaneni et al., 2017; Karunakaran et al., 2017).

As lesões periapicais são resultado de uma resposta inflamatória, assim como, uma reação imune em resposta à agressão de micro-organismos que invadem e colonizam o sistema radicular. Como consequência, a indução da resposta do hospedeiro estimulado pelos componentes estruturais bacterianos é a liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas pró e anti-inflamatórias, principalmente IL-1 β , TNF- α , prostaglandinas, como também o recrutamento de células inflamatórias e ativação de osteoclastos que resulta em reabsorção óssea (Handal et al., 2009; Spolidorio, Duque, 2013).

O favorável prognóstico para lesões periapicais ocorre quando são diagnosticadas corretamente e o tratamento é realizado com materiais com boa biocompatibilidade, atingindo a normalidade clínica e radiológica (Veeramachaneni et al., 2017; Cosme-Silva et al., 2016).

O tratamento do canal radicular se dá pela eliminação da bactéria do sistema de canais radiculares e pela remoção mecânica de dentina infectada e remoção química da bactéria (Yoneda et al., 2017).

As células inflamatórias e as células de reabsorção formam um complexo sistema, responsável pelo processo de reabsorção óssea. Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea, levando a formação de escavações na dentina ou no osso, conhecida como lacuna de Howship. O mecanismo de reabsorção óssea requer a adesão dos osteoclastos à superfície óssea, a partir desse mecanismo ocorre a desmineralização bem como a degradação da matriz do tecido ósseo (Ferreira et al., 2006; Spolidorio, Duque, 2013).

O tecido ósseo é um tecido com alta capacidade de regeneração, assim, experimentos vêm sendo estimulados a serem estudados, utilizando a associação de diferentes biomateriais a diversas substâncias objetivando a reconstrução de defeitos ósseos (Sicca et al., 2000; Nacer, 2009; Chai et al., 2017). Esses defeitos são provenientes de patologias congênitas ou adquiridas, como infecções, traumatismos e vários outros fatores clínicos que podem influenciar a funcionalidade das áreas afetadas.

Adicionalmente, com o envelhecimento da população, na odontologia as doenças periodontais são mais frequentes. Assim, devido aos danos causados pelos agentes patogênicos há necessidade de proteção e tratamento dos tecidos periodontais. Consequentemente, vem se tornando bastante comum a utilização de procedimentos regenerativos na restauração de tecidos periodontais (Andrei et al., 2018).

A pesquisa com os biomateriais requer um estudo detalhado e o sucesso no desenvolvimento de um biomaterial depende de múltiplos fatores físicos, químicos, biológicos, clínicos e tecnológicos. A resposta fisiológica decorrente da interação biológica depende das características físico-químicas do material e

das propriedades de superfície sendo necessário identificar e controlar estes fatores a fim de garantir a aderência celular na interface, assim como potencializar esta interação a fim de alcançar resultados eficientes e reprodutíveis (Kawachi et al., 2000; Orefice et al., 2006; Bostancioglu et al., 2017).

Os biomateriais são empregados em componentes implantados no corpo humano doente ou danificados. Polímeros, cerâmicas, metais podem ser usados como biomateriais (Callister Jr, Rethwisch, 2016). Um biomaterial pode ser definido como uma substância de origem animal ou sintética, não apresentando toxicidade na sua composição, além de não ser carcinogênico ou radioativo. Podem ser utilizados de forma transitória ou permanente, degradáveis e absorvíveis, de forma que favoreçam o crescimento e reparação óssea (Vital et al., 2006; Martins et al., 2010; Dantas et al., 2011). Além da aplicação clínica sem riscos, a biocompatibilidade e a previsibilidade são características desejadas de um substituto ósseo, sendo estes os desafios encontrados no desenvolvimento destes produtos (Kawachi et al., 2000; Sicca et al., 2000; Santos GG et al., 2010).

Há uma variedade de opções para enxertos ósseos, associados a um avanço no aperfeiçoamento e desenvolvimento de materiais para esse fim. Os enxertos orais podem ser autólogos (ossos colhidos do próprio corpo do paciente, muitas vezes da crista ilíaca), aloenxerto (osso cadavérico geralmente obtido de um banco de osso) ou sintético (muitas vezes feito de hidroxiapatita ou outras substâncias naturais e biocompatíveis) com similar propriedade mecânica ao osso (Kumar et al., 2013).

A área de pesquisa multidisciplinar e grande responsável na reparação e reconstrução de lesões ósseas é a engenharia de tecidos, cuja finalidade é solucionar as limitações dos diferentes tipos de defeitos ósseos. O princípio da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de arcabouços, cujo nome é

conhecido na literatura pelo termo em inglês *scaffolds*, é designado como matrizes tridimensionais porosas. Células osteoprogenitoras são aplicadas em *scaffolds* associadas sob a estimulação de fatores de crescimento para produzir substitutos biológicos, através da estimulação da capacidade natural de regeneração dos tecidos do paciente (Moreno, 2014; Zeeshan et al., 2017).

Nos últimos anos, os polímeros biodegradáveis tais como poli (ácido láctico) (*Polylactic Acid*, PLA), policaprolactona (*Poly ϵ – Caprolactone*, PCL) e copolímeros têm sido pesquisados para aplicações como matriz extracelular em bioimplantes (Hutmacher, 2000; Agrawal, Ray, 2001; Barber et al., 2013). Segundo Santos Jr et al. (2007) os materiais poliméricos podem servir como suporte para o crescimento celular, permitindo em alguns casos penetração de vasos sanguíneos nas regiões lesadas. O objetivo principal na escolha de um excelente polímero é possuir uma interação efetiva no sítio de implantação, dessa forma busca-se a produção de polímeros que possuam uma boa interação polímero-célula, de modo que, apresentem características físico-químicas e mecânicas próximas ao tecido que serão implantados. O balanço adequado de hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, disposição de cargas elétricas, dureza, elasticidade e resistência são alguns dos parâmetros das características mecânicas (Santos Jr et al., 2007).

Uma boa integração do bioimplante com a célula ou tecido depende da própria estrutura deste. Os polímeros poli (ácido láctico) (PLA) e policaprolactona (PCL) são polímeros sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis, pertencentes à família dos poliésteres alifáticos e possui tempo de degradação controlável. O PLA apresenta taxa de degradação *in vivo* rápida enquanto o PCL apresenta degradação mais lenta, sendo ideal para condições médicas que necessitam de um tempo prolongado para regeneração óssea (Merolli et al., 2001; Barbanti et al., 2006; Beachley, Wen, 2010; Zou et al.,

2012), porém, segundo Nair e Laurencin (2007) estes polímeros têm uma baixa resistência mecânica limitando a aplicação na medicina regenerativa óssea.

Para solucionar esta baixa resistência mecânica destes polímeros, sugere-se a incorporação de fibras de silicato de cálcio, as quais podem melhorar a resistência mecânica e também a biocompatibilidade (Hayashi et al., 2000; Callister Jr, 2008; Motisuke, Bertran, 2012).

García-González et al. (2018) demonstraram que a combinação adequada da morfologia e liberação de vancomicina *in vivo* em *scaffolds* feitos de *Poly ϵ - Caprolactone* contendo agente antimicrobiano depende do tempo e das propriedades biológicas, como a viabilidade celular e proliferação, osteodiferenciação e integração tecido-*scaffold*.

A partir da metodologia empregada na produção de membranas porosas de polímeros PLA e PCL incorporadas com fibras de silicato de cálcio, o presente estudo analisa viabilidade celular, a genotoxicidade; a atividade da osteogênese pela produção de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização. Mas também a influência das membranas poliméricas na redução de biofilmes monotípicos de *Enterococcus faecalis*.

Sabe-se que a avaliação da citotoxicidade pelo teste colorimétrico Alamar Blue determina a viabilidade das células, o princípio é a redução do corante azul e não fluorescente; resazurina em resorufina, corante rosa com alta fluorescência, em células metabolicamente ativas. Promove resultados rápidos e confiáveis em um teste bastante simples (O'Brien et al., 2000; Al-Nasiry et al., 2007).

Avaliada através dos danos causados no DNA por agentes genotóxicos, a genotoxicidade é detectada por vários métodos, incluindo observações de alterações morfológicas tais como os micronúcleos (MN), onde detecta fragmentos de cromatina resultantes da quebra cromossômica. A análise dos

valores expresso do índice dos micronúcleos tem apresentado de uma forma simples e rápida a estimativa da presença de alterações cromossômicas (Oliveira et al., 2017).

Em relação aos indicadores da osteogênese, segundo Beloti e Rosa (2005), o conteúdo de proteína total é um importante parâmetro para verificar a capacidade de osteogênese celular, está diretamente relacionada com a capacidade de síntese de células ósseas. Já a fosfatase alcalina é uma enzima essencial na mineralização da matriz óssea e a formação de nódulos é considerado um precedente de importante propriedade na mineralização (Anderson et al., 2004; Pang et al., 2006).

O sucesso no tratamento do canal radicular se dá pela eliminação da infecção bacteriana, mas é bastante difícil devido à complexidade da estrutura anatômica do sistema do canal radicular, como também pelo biofilme em que as bactérias estão incorporadas (Wang et al., 2012; Pereira et al., 2017; Yoneda et al., 2017).

O biofilme é definido com uma comunidade de micro-organismos embutidos em uma matriz extracelular presente em superfície sólida. O biofilme proporciona proteção ao micro-organismo, como por exemplo, substâncias tóxicas como os antibióticos, além de proporcionar defesa frente aos mecanismos de defesa imune e inflamatória inata e adaptativa do hospedeiro (Jorge, 2012; Garcia-Alvarez et al., 2017).

Segundo Al-Ahmad et al. (2008) é primordial que o biomaterial apresente uma superfície antibacteriana ou que restrinja a adesão da bactéria, pois durante os procedimentos cirúrgicos em que os *scaffolds* devem ser aplicados em pacientes podem ser expostos a bactérias da saliva e a microbiota bucal.

Na formação de lesões periapicais, um grupo seletivo de micro-organismos coloniza o espaço do canal radicular. Normalmente o espaço do canal radicular é estéril (Handal et al., 2009). Qualquer espécie encontrada é considerada um

patógeno endodôntico. Estudos moleculares e de culturas permitiram a avaliação da diversidade microbiana nas infecções endodônticas, associadas a diferentes tipos de infecções. As espécies mais frequentemente isoladas na infecção primária pertencem aos seguintes gêneros: *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Propionibacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Treponema*. Os principais micro-organismos relacionados à infecção secundária e ou persistente: *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fungos* (Kenneth, Cohen, 2011; Jorge, 2012).

Enterococcus são bactérias Gram-positivas que geralmente se dispõem em pares e em cadeias curtas, são catalase negativos, anaeróbicos facultativos. São comensais no trato gastrointestinal, porém podem ser encontrada na cavidade oral, vesícula biliar e trato geniturinário. Podem também ser encontrados no solo e em plantas. Dentro do gênero *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* são clinicamente mais relevantes, frequentemente causam infecções endodônticas difíceis de curar, devido a sua resistência antibiótica. Além dos fatores de virulência do micro-organismo, que contribui para a gravidade das infecções enterocócicas (Sundqvist et al., 1998; Guzman Prieto et al., 2016; Heidari et al., 2017; Gao et al., 2018). É considerado o principal patógeno responsável pelo fracasso do tratamento endodôntico, estudos revelam que 90% dos casos de infecção persistente ou secundária está associada à espécie. *Enterococcus faecalis* tem a capacidade de aderir e formar biofilme na dentina sob diferentes condições ambientais, como a pouca concentração de nutrientes, pH extremos. Apresenta capacidade de penetrar nos túbulos dentinários e de resistir aos efeitos do hidróxido de cálcio (Kayaoglu et al., 2005; Kishen et al., 2008; Lacerda et al., 2016; Yoo et al., 2018).

Atualmente, se faz necessário desenvolver novas técnicas de fabricação de biomateriais, como também, compreender através de um estudo mais detalhado

as características de suas propriedades. Este trabalho teve por objetivo investigar o comportamento celular *in vitro*, como também a formação de biofilme em contato com membranas reabsorvíveis porosas PLA e PCL, incorporadas com fibras de silicato de cálcio, se apresentam biocompatibilidade e capacidade osteocondutora, para que possam ser aplicados em eventos relacionados à regeneração óssea guiada em lesões periapicais.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar *in vitro* o comportamento de osteoblastos (da linhagem celular MG-63) em contato com membranas reabsorvíveis porosas de poli (ácido lático) (PLA) e policaprolactona (PCL), incorporadas com fibras cerâmicas de silicato de cálcio, visando aplicação na regeneração óssea guiada em lesões periapicais.

Para alcançar o objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos.

2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a citotoxicidade das membranas reabsorvíveis de polímeros PLA e PCL incorporadas com fibras de silicato de cálcio;
- b) Determinar possíveis mutações cromossômicas no DNA;
- c) Avaliar os indicadores da atividade celular e da osteogênese;
- d) Verificar se as membranas reabsorvíveis de polímeros PLA e PCL incorporadas com fibras de silicato de cálcio influenciam na redução de biofilmes monotípicos de *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), quando associados ou não a solução gluconato de clorexidina a 0,12%.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de membranas poliméricas com incorporação de fibras de silicato de cálcio

O desenvolvimento de membranas poliméricas porosas incorporadas com fibras de silicato de cálcio foi preparado experimentalmente em colaboração com a Universidade Federal do Estado de São Paulo (Instituto de Ciência e Tecnologia, UNIFESP), no departamento de Engenharia de Materiais (Laboratório de Biocerâmicas – BIOCERAM, Unidade Talim. ICT/UNIFESP) sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eliandra de Sousa Trichês. A obtenção das fibras de silicato de cálcio foi por meio do método de fusão de sais, utilizando a mistura dos sais de cloreto de sódio, cloreto de potássio, carbonato de cálcio e dióxido de silício, os quais receberam tratamento térmico com taxa de aquecimento de 2°C/min até atingir a temperatura de 950°C/12 h. Para a preparação das membranas com a incorporação de silicato de cálcio, inicialmente os polímeros, PLA e PCL, foram diluídos em clorofórmio 10% m/v. A dispersão das fibras de silicato de cálcio foi realizada em ultrassom de ponta. As soluções foram inseridas em formas circulares de 0,5 nm de diâmetro e mantidas em temperatura ambiente para evaporação lenta com umidade controlada do ar de 70% a 80% por 12 h. A morfologia das membranas foi avaliada por microscópio eletrônico de varredura (MEV). Previamente aos testes biológicos, todas as amostras foram expostas à esterilização com radiação ultravioleta por 30 min.

3.2 Grupos experimentais

Foram testados seis grupos experimentais, a partir da concentração do teor de silicato de cálcio incorporado à membrana, conforme os seguintes grupos, demonstrados no quadro 1.

Quadro 1- Formulação das amostras de estudo

PLA + (Porcentagem do teor de silicato de cálcio)	PCL + (Porcentagem do teor de silicato de cálcio)
Porosa (sem adição de CaSiO_3)	—
5%	—
10%	—
—	Porosa (sem adição de CaSiO_3)
—	5%
—	10%

Fonte: Elaborado pelo autor.

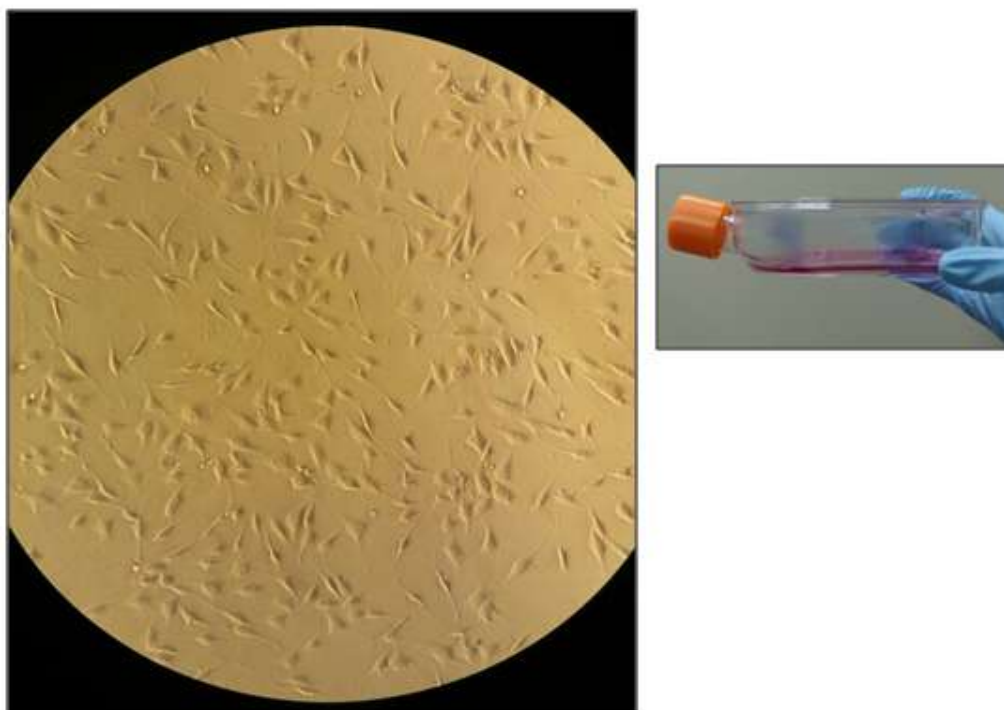
3.3 Análises de Biocompatibilidade

3.3.1 Cultivo celular

As células osteoblásticas MG-63 foram obtidas no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células – LEIC, (ICT/Unesp). As células foram

cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Cultilab, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas em estufa a temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, Figura 1. O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias e as células foram subcultivadas quando atingissem a subconfluência (85%), o controle ocorreu a partir do auxílio do microscópio de luz invertida (Carl Zeiss- Alemanha). Foram utilizados materiais estéreis em todos os procedimentos além de serem manipulados no interior da câmara de fluxo laminar.

Figura 1 – Células osteoblásticas MG-63 cultivadas em meio de cultivo DMEM. Visualizados em microscopia óptica



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2 Citotoxicidade – Ensaio de Alamar Blue

Para o teste de citotoxicidade, foram plaqueadas 20.000 células por poço (n=3 para cada grupo experimental) e incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24 h. Após este período, as culturas celulares foram expostas aos grupos experimentais e mantidas em estufa por mais 24 h. O grupo controle foi determinado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. Assim, posteriormente ao período de 24 h, realizou a remoção do conteúdo dos poços e a placa foi lavada três vezes com PBS estéril para descartar células mortas e resíduos. Após a lavagem, acrescentou 50 µL do reagente Alamar Blue (Thermo Scientific – EUA) a 10% em meio de cultura (DMEM) em cada poço e a placa foi levada a estufa por 4 h, sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Durante este período, a resazurina azul não-fluorescente é reduzida a resofurin de cor rosa fluorescente. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância dos poços em espectrofotômetro de microplacas (Cambrex Elx808cse - Lonza) com comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem em relação ao grupo controle (=100%), conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{Densidade Óptica} \times 100) / \text{Densidade Óptica do Grupo Controle}$$

3.3.3 Genotoxicidade – Ensaio de Micronúcleo

Neste estudo, os osteoblastos MG- 63 foram plaqueados em uma concentração de 20.000 células em uma placa de 24 poços (n=3 para cada grupo

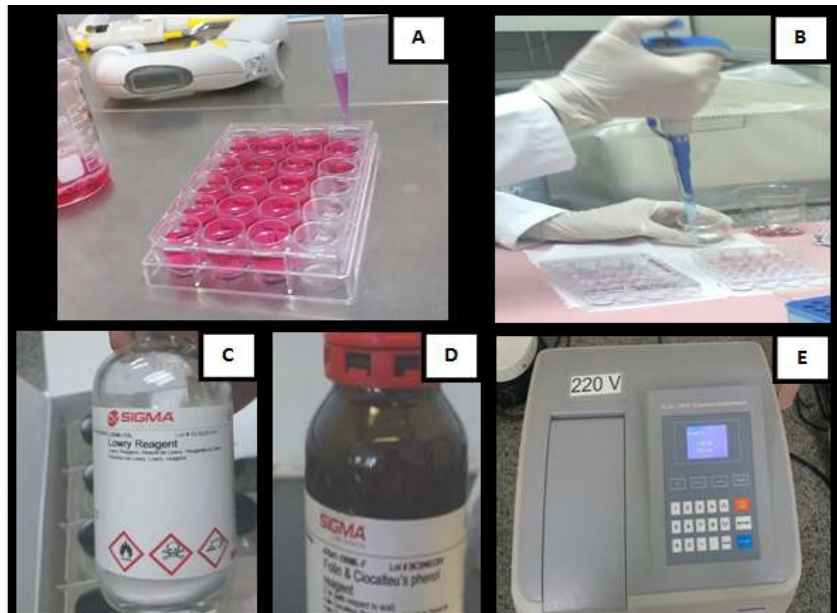
experimental) com meio para cultura celular e colocados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 h. Após este período, as células foram expostas aos grupos experimentais e mantidas em estufa por 24 h (37°C, 5% de CO₂). O grupo controle foi determinado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. Para realização da leitura, as amostras foram retiradas e as células foram fixadas com formaldeído a 4%. Após este procedimento foram adicionados aos poços solução salina de tampão de fosfato (PBS, Cultilab) e solução Fluoroshield com DAPI (Sigma- Aldrich), aos quais foram fotografados com câmera digital acoplada a microscópio de luz invertida (Leica DFC310 FX, Mannheim, Baden – Württemberg, Alemanha). Foram realizadas 10 fotos em diferentes campos nos poços e o número de micronúcleos foi determinado em 2.000 células/poço. Os micronúcleos foram identificados como, estruturas de DNA contidas no citoplasma separadas do núcleo principal, com uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Células em mitose e que exibiram fragmentação nuclear por apoptose não foram consideradas na contagem.

3.3.4 Conteúdo de Proteína Total

Para o teste de proteína total as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3 para cada grupo experimental), foi realizado o plaqueamento de 20.000 células por poço e incubadas por 24 h a 37°C. As células foram mantidas em meio de cultura (DMEM). Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas aos grupos experimentais. O grupo controle foi caracterizado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. As culturas celulares foram mantidas em

estufa por 14 dias, o conteúdo de proteína total foi calculado segundo o método modificado de Lowry et al. (1951). Para a extração das proteínas foi acrescentado 2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma- Aldrich) em cada poço. Após 30 min, 1 mL da solução de cada poço foi misturada com 1 mL da solução Lowry (Sigma- Aldrich) e foram deixados por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente foram mantidos durante 30 min a essa solução, 1 mL do reagente de Folin e Ciocalteu (Sigma- Aldrich). A absorbância foi determinada a 680 nm em espectrofotômetro, como pode ser observado na Figura 2. O conteúdo de proteína total calculado por meio de uma curva-padrão determinada a partir da albumina bovina e expresso em $\mu\text{g/mL}$.

Figura 2 – Teste de proteína total



Legenda - (A) Cultura celular mantidas em meio DMEM. (B) Aplicação de lauril sulfato de sódio 0,1% sobre a placa de 24 poços. (C) Reagente de Lowry. (D) Reagente de Folin e (E) Espectrofotômetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.5 Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada após 14 dias ($n=3$ para cada grupo experimental), nos mesmos lisados utilizados para quantificar a proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, ref. 40), Figura 3. Inicialmente, 50 μL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1. À solução foi acrescentada alíquota de 50 μL dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 min à 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade da fosfatase alcalina avaliada seguindo os procedimentos dos cálculos preconizados na bula do kit comercial. Os dados obtidos foram expressos como atividade da fosfatase alcalina normalizada pelo conteúdo de proteína total e os valores apresentados em μmol de timolftaleína/h/ μg de proteína/mL.

Figura 3 – Teste da fosfatase alcalina



Legenda - (A) Kit comercial do fabricante (Labtest). (B) Espectrofotômetro.
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.6 Formação dos nódulos de mineralização

Para a formação de nódulos de mineralização as células foram colocadas em placas de 24 poços (n=3 para cada grupo experimental), foi realizado o plaqueamento de 20.000 células por poço e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, o meio antigo foi removido e as culturas celulares foram expostas aos grupos experimentais. O grupo controle foi caracterizado como sendo o poço com a presença de células e ausência das membranas poliméricas testadas. As culturas celulares foram mantidas em estufa por 21 dias. As células aderidas foram lavadas em 1 mL de solução de Hank's (Sigma) a 37°C por duas vezes e as células foram fixadas em 2 mL de álcool 70% por 1 h a 4°C. Em seguida, o álcool foi retirado e os poços lavados com 1 mL PBS (Cultilab) por duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado, a cultura celular lavada com 1 mL de água deionizada por duas vezes e corada com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 min à temperatura ambiente. Depois disso, cada poço foi lavado várias vezes com intuito de retirar o excesso de corante e as placas deixadas por 24 h em temperatura ambiente para secagem total dos poços. Depois da secagem, os poços foram avaliados qualitativamente em relação à formação de nódulos de matriz mineralizada. Essa análise qualitativa foi baseada em avaliações macro e microscópicas das formações nodulares de matriz mineralizada, as quais foram fotografadas com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels) acoplada em microscópio de luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40 C, Alemanha).

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.4.1 Análise da ação antimicrobiana em cultura planctônica

A cepa de referência (ATCC - *American Type Culture Collection*) de *E. faecalis* (ATCC 4083) proveniente do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (ICT/Unesp) foi semeada em meio sólido (*Brain Heart Infusion* – BHI) e mantida em estufa microbiológica a 37°C por 24 h, para ser reativada. A partir do crescimento bacteriano em placa, foram alçadas as colônias da cepa reativa, estas foram assim diluídas em um tubo contendo solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e deste modo a suspensão foi padronizada em espectrofotômetro na concentração de 10^6 células/mL. Na placa de 24 poços, foram adicionados os grupos experimentais, em seguida foram adicionados em cada poço da microplaca 500 µL do caldo BHI. Após, foram acrescentados 500 µL do inóculo padronizado em solução salina estéril (NaCl 0,9%) em todos os poços. A placa foi levada para incubação de 24 h, após este período foi feita a leitura da placa macroscopicamente, por meio da visualização do poço que não apresentou turvação, deste modo à redução do crescimento microbiano ou inibição do crescimento microbiano pôde ser determinada.

Para verificar a concentração da membrana polimérica que fosse capaz de promover a redução ou possível morte bacteriana (atividade bactericida) foi utilizado o teste da gota, assim, foi inoculada em placas contendo ágar BHI, 10 µL de cada poço dos grupos experimentais, de acordo com a concentração de seus constituintes, polímeros de PLA e polímero de PCL. Assim, após 48 h de incubação, na placa que não fosse observado o crescimento de colônias, foi determinada a ação microbicida.

3.4.2 Análise da redução bacteriana em biofilme monotípico de *Enterococcus faecalis*

Com base no resultado apresentado pelos polímeros de PLA e PCL no teste da gota, foi verificado também se as membranas poliméricas influenciam na redução de biofilmes monotípicos de *E. faecalis* quando associadas ou não a solução antisséptica de gluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate PerioGard®).

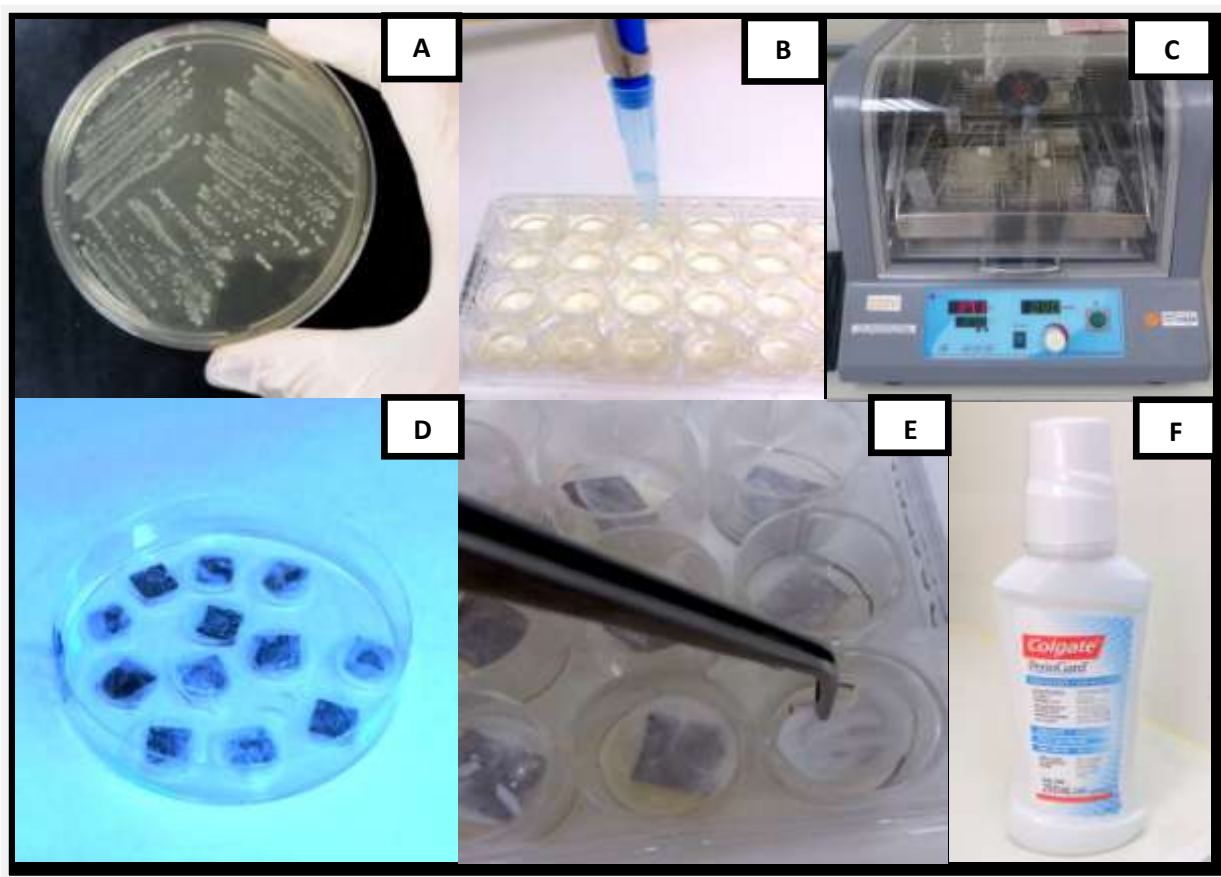
Para a formação *in vitro* do biofilme, foi utilizada a cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 4083), utilizando como corpo de prova o fundo da placa de microtitulação de 24 poços, figura 4.

Para o preparo do inóculo, o micro-organismo *E. faecalis* foi plaqueado em meio sólido *Brain Heart Infusion Ágar* (BHI) e incubados por 24 h em estufa a 37°C. As colônias isoladas de *E. faecalis* foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI e incubados em agitação por 24 h a 37°C. Após o período, o tubo foi centrifugado para a formação do *pellet* e o sobrenadante descartado. Para o processo de lavagem foi acrescido 3 mL de solução salina estéril e homogeneizado em vórtex e em seguida centrifugado, este processo foi realizado duas vezes. Para o preparo da suspensão padrão, o tubo contendo o *pellet* previamente lavado foi ressuspensionado em vórtex com 20 mL de solução salina estéril. Esta solução foi padronizada em espectrofotômetro na concentração de 10^7 células/mL (B582, Micronal, São Paulo, Brasil).

Para a formação do biofilme foram inoculados 500 µL da suspensão padronizada de células de *E. faecalis* e 500 µL de caldo BHI. A placa foi incubada em estufa a 37°C sob agitação de 75 rpm por 24 h. Após esse período foi trocado o meio de cultura e novamente uma nova incubação de 24 h, totalizando 48 h. Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi

aspirada para remover as células frouxamente aderidas. Posteriormente foram acrescidos 500 µL do meio líquido BHI e as amostras dos polímeros PLA e PCL por um período de 24 h.

Figura 4 – Macrofotografias do detalhamento experimental



Legenda - (A) Placa de Petri com o micro-organismo *Enterococcus faecalis*. (B) Aplicação da suspensão bacteriana padronizada sobre a placa de 24 poços. (C) Placa de 24 poços mantida em estufa por 37°C sob agitação de 75 rpm. (D) Esterilização das amostras por exposição à luz UV. (E) As amostras inseridas sobre o biofilme formado. (F) Solução tratamento o gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard® Colgate).

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.2.1 Tratamento com o gluconato de clorexidina

Após o período de formação do biofilme e aplicação das amostras dos polímeros PLA e PCL foi acrescida solução de gluconato de clorexidina a 0,12% por um período de 5 min. A solução salina estéril foi utilizada para os grupos não tratados, ou seja, sem a presença do tratamento com o gluconato de clorexidina a 0,12%. O grupo controle foi caracterizado como sendo o poço com a presença de micro-organismos e ausência das membranas poliméricas testadas. Em todos os poços dos respectivos tratamentos foram aplicadas 500 µL/poço. Posteriormente, estas soluções foram descartadas e foram removidas as amostras dos polímeros PLA e PCL. O biofilme foi lavado com solução fisiológica estéril.

3.4.2.2 Atividade metabólica dos micro-organismos pelo teste de MTT

Subsequente ao tratamento foi adicionado 500 µL/poço de solução de MTT (3-(4,5 – Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Affymetrix, Inc., Cleveland Ohio, USA). A placa foi incubada ao abrigo de luz por 4 h em estufa a 37°C. Após o período de incubação, a solução de MTT foi retirada da placa e foram adicionados 500 µL/poço de álcool 70°. A placa foi novamente incubada durante 10 min sob agitação constante. Em seguida, a placa foi lida em microplaca a um comprimento de onda de 570 nm e as densidades ópticas convertidas, através da fórmula abaixo:

$$\% \text{ Atividade metabólica} = (\text{DO Grupo Experimental} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

3.5 Análise estatística

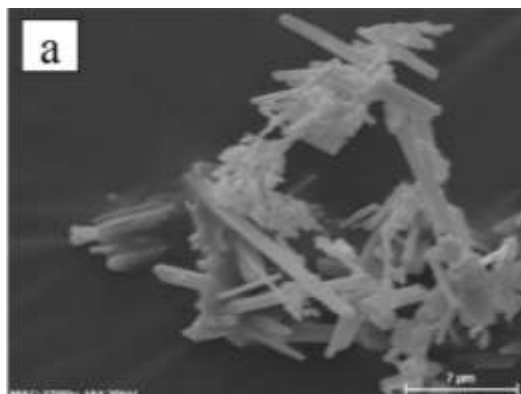
Os dados obtidos pelos testes de citotoxicidade (Alamar Blue), genotoxicidade (micronúcleo), atividade de fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e o teste de MTT foram submetidos ao teste de normalidade e analisados estatisticamente pelo teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey, com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., California, CA, USA) e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação das membranas poliméricas por MEV

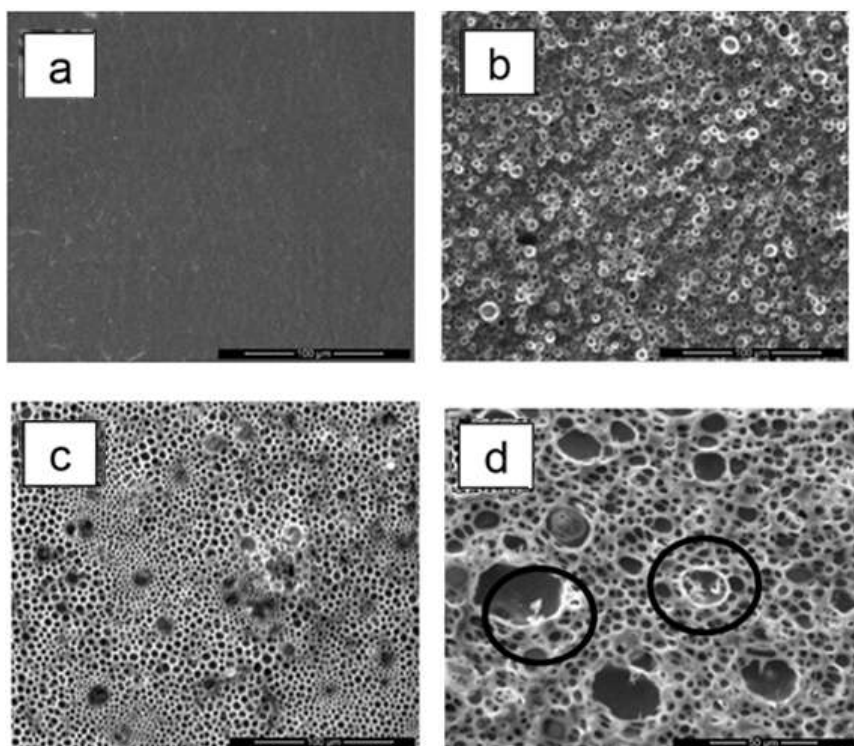
A morfologia das membranas porosas foi analisada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL 6400). As imagens foram obtidas visando verificar as modificações da morfologia da superfície das membranas, conforme demonstrado nas Figuras 5-7.

Figura 5 – Micrografia de MEV das fibras de silicato de cálcio



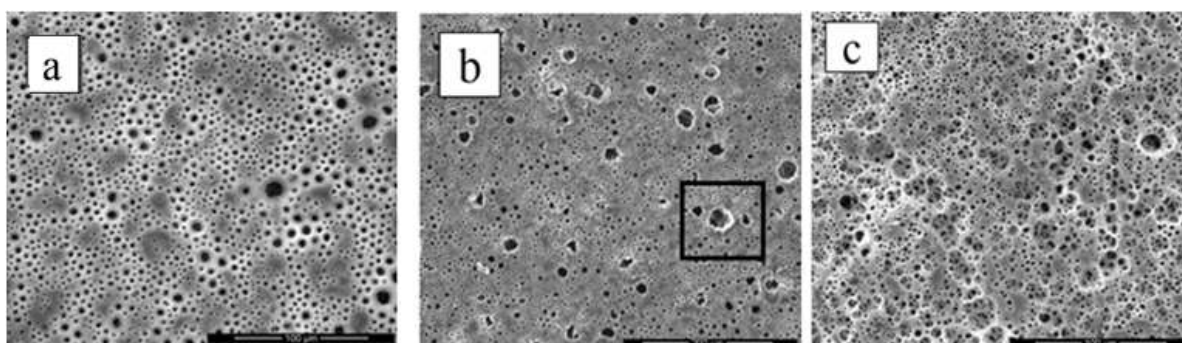
Legenda - (a) Fibras de silicato de cálcio.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Micrografia de MEV dos grupos experimentais PLA



Legenda - (a) PLA P (superfície superior), (b) PLA P (lado oposto) (c) PLA 5%, (d) PLA 10%, observar nas áreas delimitadas a exposição das fibras de silicato de cálcio.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Micrografia de MEV dos grupos experimentais PCL



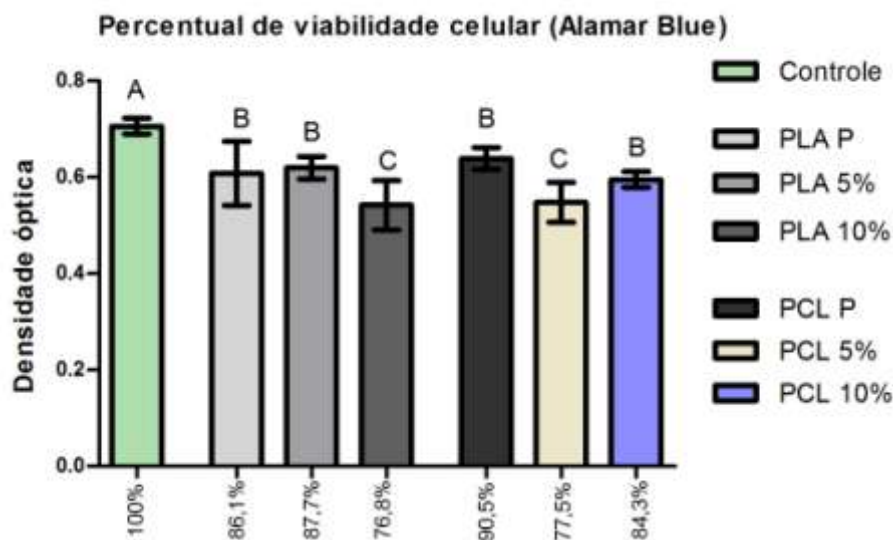
Legenda - (a) Micrografias de MEV da membrana PCL P, (b) PCL 5%, observar na área delimitada a exposição das fibras de silicato de cálcio e (c) PCL 10%.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade pelo teste de Alamar Blue foi utilizado para comparar a proliferação celular nas membranas poliméricas a partir de diferentes concentrações na formulação das amostras, com base na avaliação da viabilidade celular quantitativamente. Os resultados obtidos na viabilidade celular dos osteoblastos MG-63 estão expressos na Figura 8. O grupo controle, não foi exposto aos biomateriais, e foi considerado como 100% de células viáveis.

A análise desses dados mostrou alta viabilidade celular em todos os grupos experimentais, uma vez que, nenhum dos grupos foi menor que 70% (Ródenas- Rochina et al., 2013). Contudo, os valores obtidos de viabilidade celular pelos grupos experimentais foram menores e exibiram diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando comparados com o controle. O grupo PCL P apresentou maior viabilidade celular 90,5%, seguido do grupo PLA 5% que resultou em 87,7%, PLA P em 86,1% e PCL 10% que resultou em 84,3% de viabilidade celular. Por outro lado, os grupos PCL 5% e PLA 10% apresentaram menor viabilidade celular, 77,5% e 76,8%, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0.05$).

Figura 8 – Ensaio de citotoxicidade celular de osteoblastos MG-63 pelo teste Alamar Blue



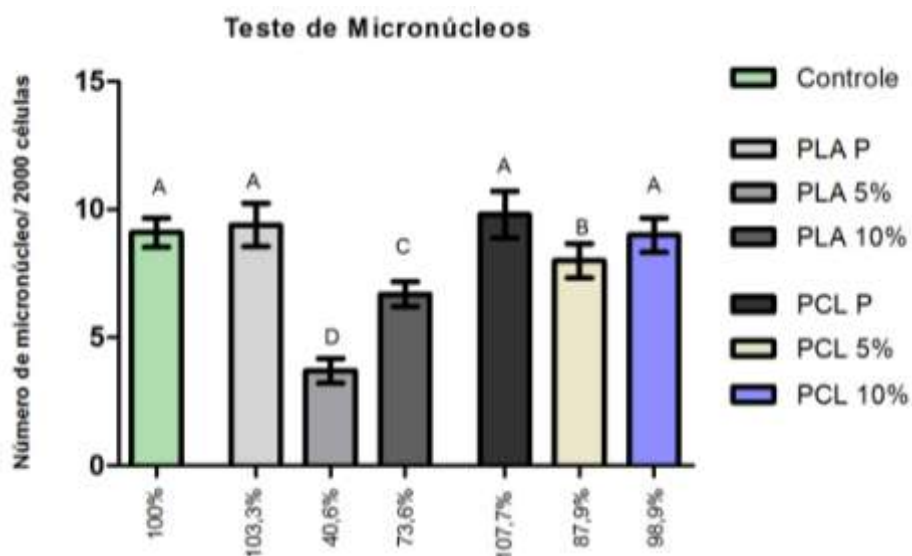
Legenda - Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Ensaio de genotoxicidade

De acordo com o presente estudo por meio da contagem de micronúcleos, os grupos experimentais não apresentaram genotoxicidade, como pode ser observado na Figura 9. Nenhum material testado foi genotóxico, pois todos apresentaram número de micronúcleos semelhante ou menor ao grupo controle, apresentando significância estatística ($p < 0.05$).

Figura 9 – Ensaio de genotoxicidade por meio do teste de micronúcleos



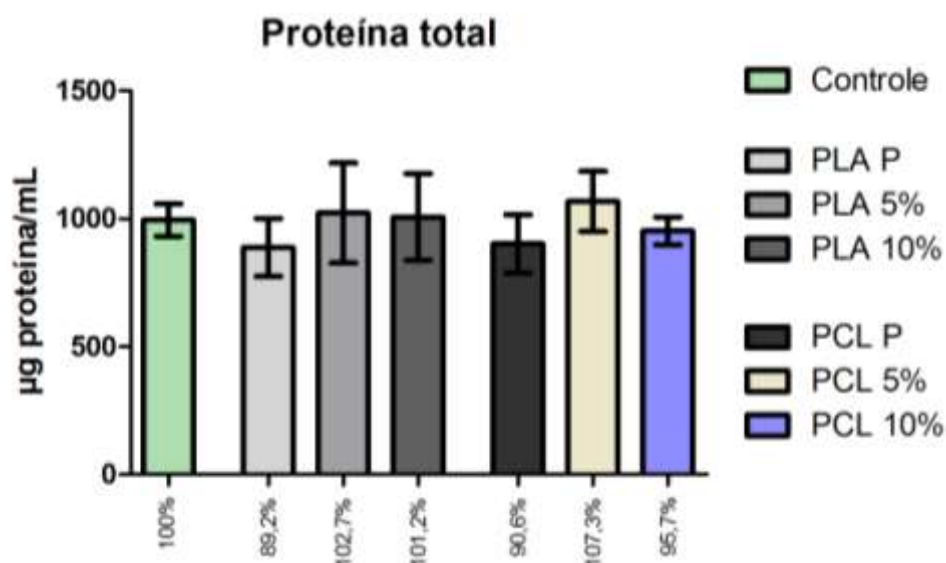
Legenda - Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Conteúdo de Proteína Total

Como pode ser observado na Figura 10, embora não tenha sido observada diferença estatística entre todos os grupos, observou-se que o grupo PCL 5% apresentou maior expressão de proteína em relação aos grupos PCL 10% e PCL P ($p > 0.05$). Na análise do PLA, foi observado também que o grupo PLA 5% apresentou maior expressão de proteína. Em contrapartida, os resultados dos grupos PLA P e PCL P indicaram menor expressão de proteínas ($p > 0.05$).

Figura 10 – Gráfico representativo do Conteúdo de Proteína Total

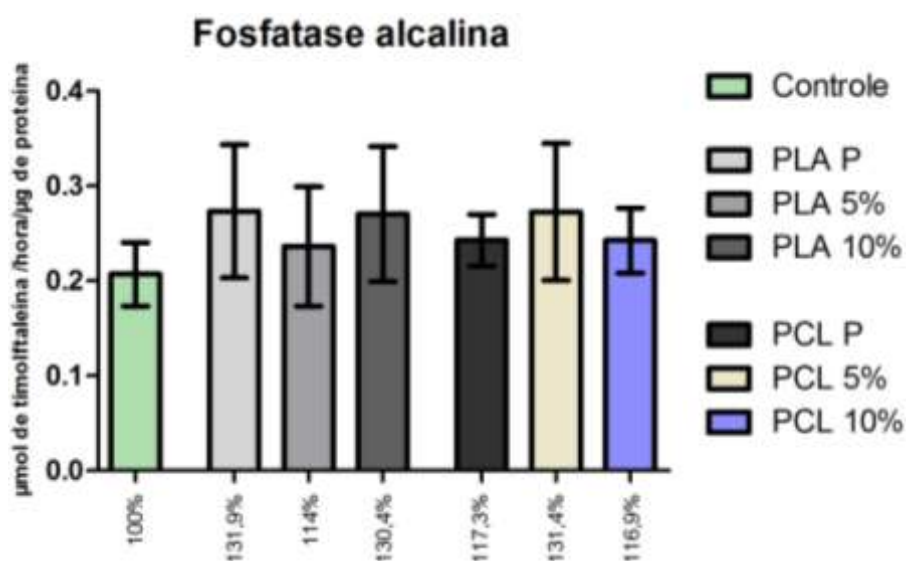


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Atividade de Fosfatase Alcalina

Em relação ao grupo contendo o polímero PLA, o grupo PLA P apresentou maior atividade de fosfatase alcalina. No entanto, o grupo PCL 5% apresentou maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao PCL 10% e o PCL P. De acordo com os valores obtidos na análise da atividade da fosfatase alcalina, todos os grupos experimentais não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0.05$) com relação ao grupo controle, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Gráfico representativo da fosfatase alcalina

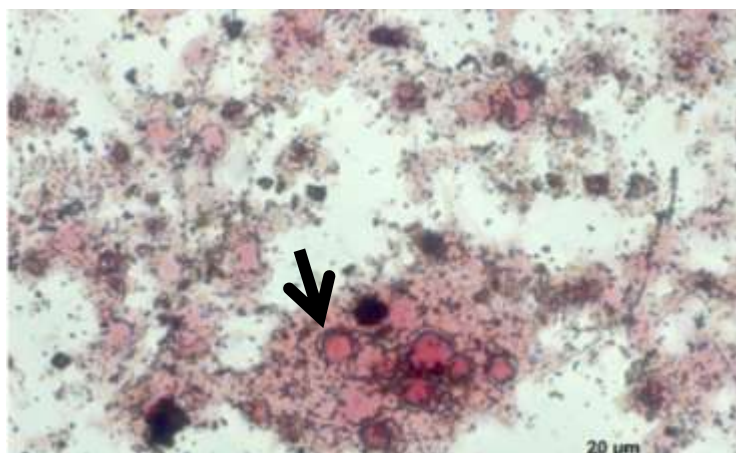


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Formação dos nódulos de mineralização

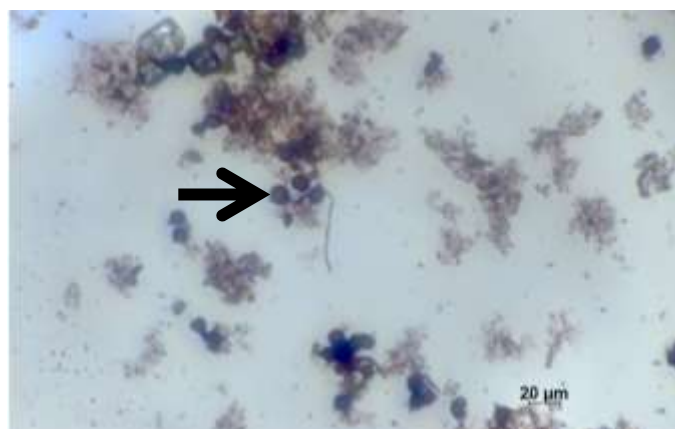
Pode-se observar que todos os grupos experimentais permitiram a formação de nódulos de mineralização. Uma vez que os grupos experimentais apresentaram quantidade de formação de nódulos semelhantes entre eles.

Figura 12 – Formações nodulares - PCL P



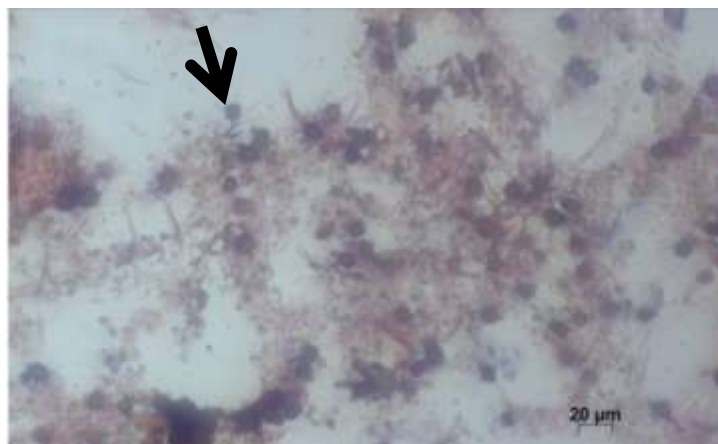
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Formações nodulares - PCL 5%



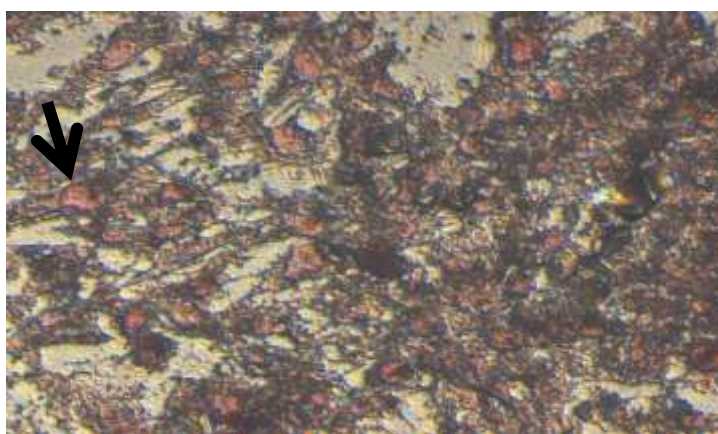
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Formações nodulares - PCL 10%



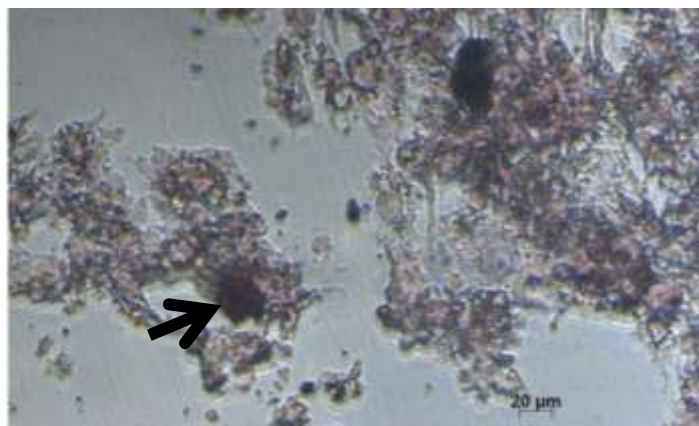
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Formações nodulares - PLA P



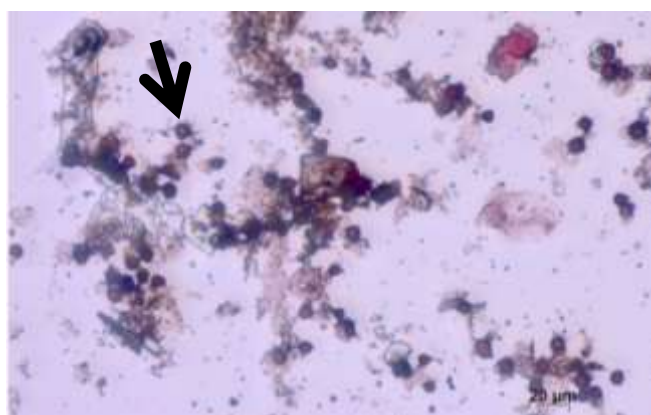
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Formações nodulares – PLA 5%



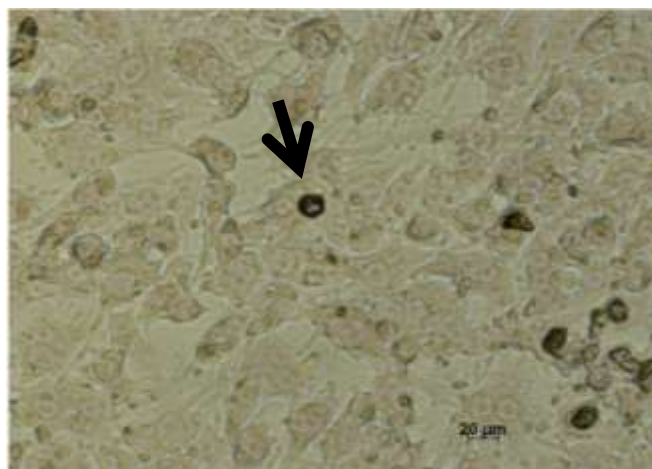
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Formações nodulares – PLA 10%



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Formações nodulares – Controle

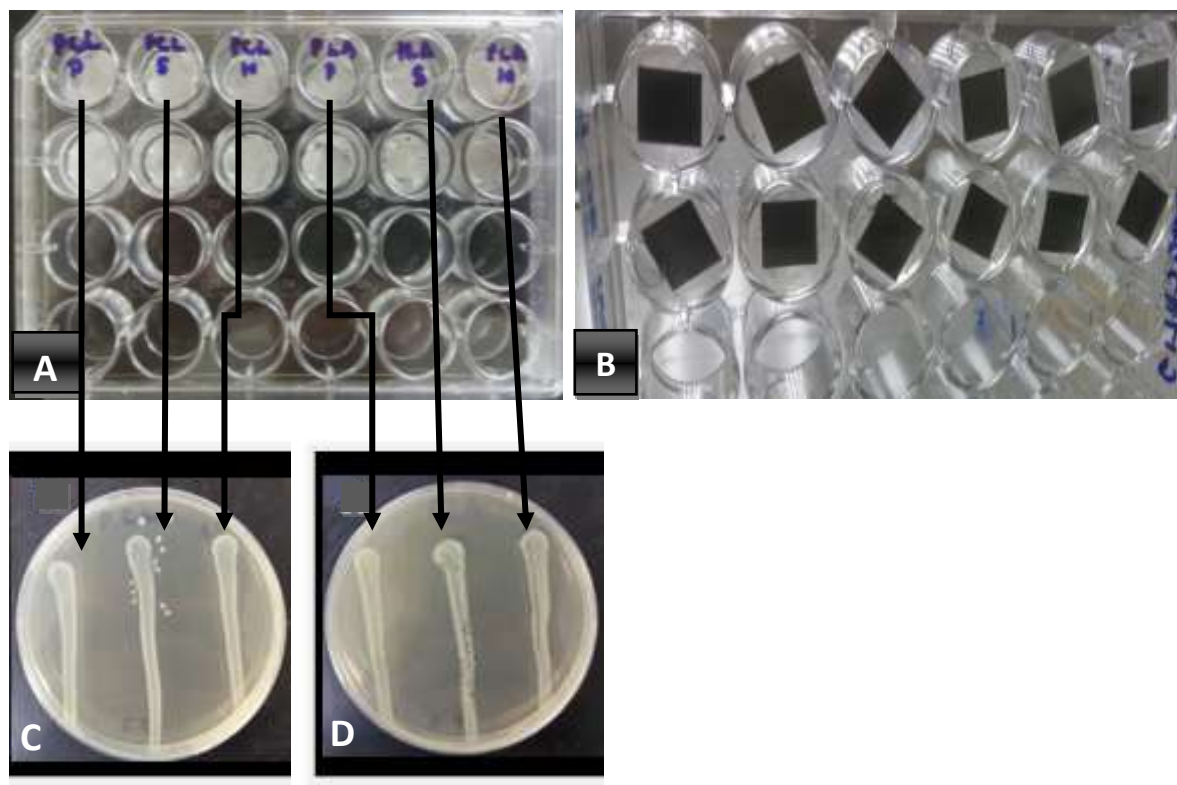


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Análise da ação antimicrobiana em cultura planctônica

Por meio do teste da gota, verificou-se que os polímeros PLA e PCL não apresentaram atividade bactericida no micro-organismo testado *E. faecalis*, como demonstra a Figura 19. Observa-se o rastro em que houve o desenvolvimento de colônias em todos os grupos analisados.

Figura 19 – Teste da gota: poços da microplaca semeados em meio sólido (ágar BHI). Demonstrando crescimento bacteriano



Legenda – (A) e (B) Observa-se a presença de turvação nos poços após incubação. (C) *Enterococcus faecalis* – (PCL P) e (D) *Enterococcus faecalis* – (PLA P) demonstrou que quando o conteúdo da placa de 24 poços foi semeado em ágar BHI houve crescimento bacteriano, conforme indicado pelas setas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

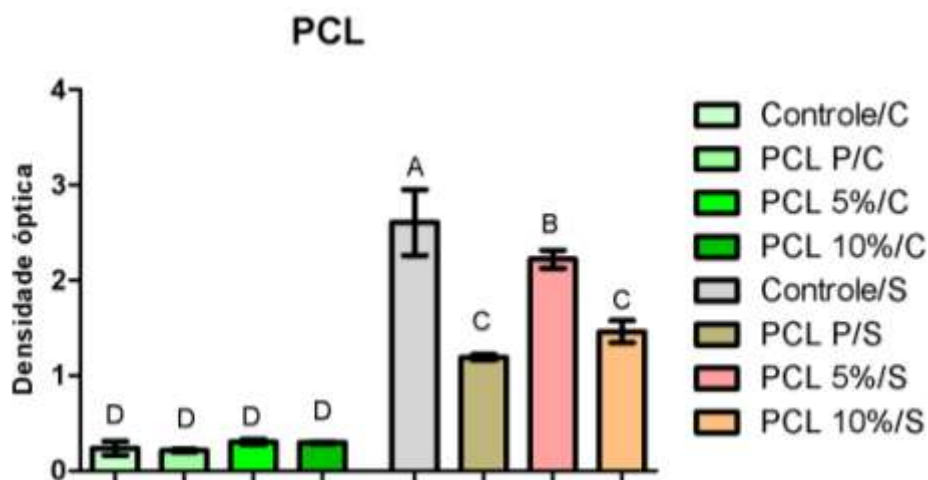
4.8 Atividade metabólica dos micro-organismos em biofilme após exposição à solução de gluconato de clorexidina pelo teste de MTT

Na avaliação da atividade dos micro-organismos em biofilme, o grupo PCL P, tratado com a solução de gluconato de clorexidina a 0,12% observou-se redução de 10,17%. Os grupos PCL 5% e PCL 10% apresentaram resultados com menor redução do biofilme, quando comparado com o controle, porém não

diferiram estatisticamente entre si ($p>0.05$). Os dados podem ser observados nas Figuras 20 e 21.

O grupo não tratado, isto é, sem a adição da solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, as membranas de PCL P reduziram a atividade metabólica de *E. faecalis* em 54,3%, já o grupo PCL 10% promoveu a redução de 43,9% e PCL 5% apresentou redução de 14,9%. Os grupos PCL P, PCL 5% e PCL 10% obtiveram reduções estatisticamente significantes ($p<0.05$), quando comparados com o grupo controle, conforme observado nas Figuras 20 e 21.

Figura 20 – Avaliação da atividade metabólica de *Enterococcus faecalis* tratado com Clorexidina e sem Clorexidina por 5 min em polímero de PCL

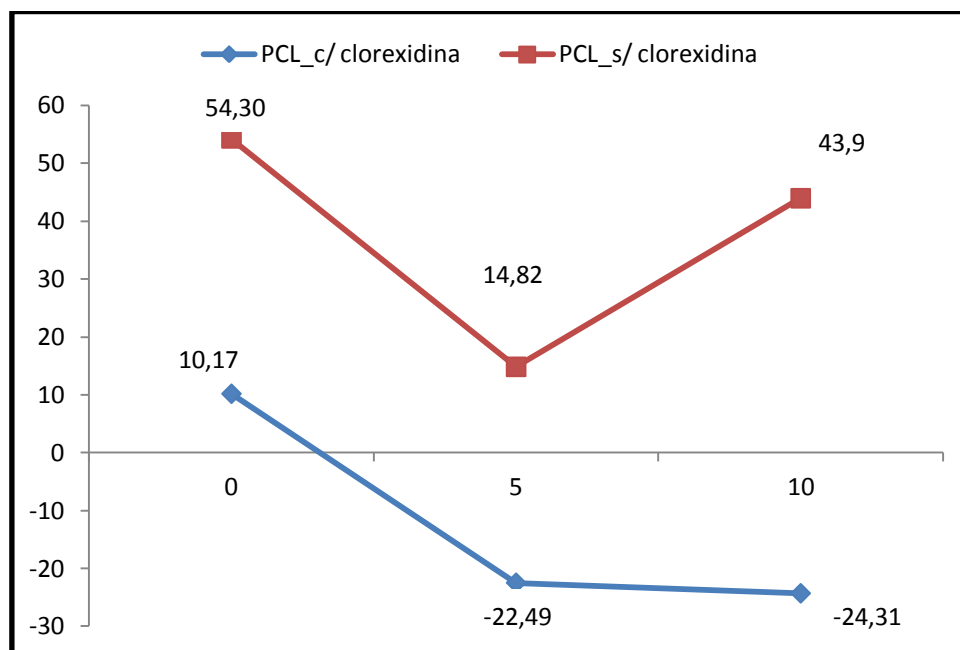


Legenda – (Controle/C) Controle com a Clorexidina; (PCL P/C) PCL P com a Clorexidina; (PCL 5/C) PCL 5% com a Clorexidina; (PCL 10/C) PCL 10% com a Clorexidina; (Controle/S) Controle sem a Clorexidina; (PCL P/S) PCL P sem a Clorexidina; (PCL 5/S) PCL 5% sem a Clorexidina; (PCL 10/S) PCL 10% sem a Clorexidina;

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, teste de Tukey, $p<0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Porcentual de redução do micro-organismo *Enterococcus faecalis* tratado com Clorexidina e sem Clorexidina em polímero de PCL pelo teste de MTT



Legenda – (0) PCL Poroso; (5) PCL 5%; (10) PCL 10%.

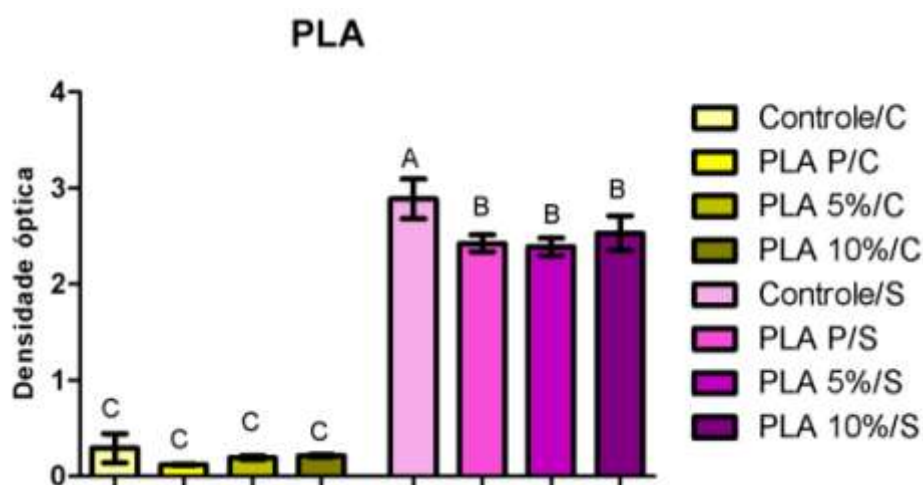
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação ao material de PLA, pode se observar que a presença da solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, causou a redução da atividade metabólica do micro-organismo *E. faecalis* em todos os grupos, sendo que o grupo PLA P apresentou a maior redução, 58,88%. O grupo PLA 5% e PLA 10% promoveram uma redução de 34,08% e 26,73%, respectivamente. Os grupos PLA P, PLA 5% e PLA 10% não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p > 0.05$), quando comparados com o controle. Os dados podem ser observados nas Figuras 22 e 23.

Sem a adição da solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, foi observado que os grupos PLA P, PLA 5% e PLA 10% apresentaram redução da atividade metabólica de *E. faecalis* em 16,01%, 17,21% e 12,28%,

respectivamente Figuras 22 e 23. Estes resultados foram estatisticamente significantes ($p < 0.05$), quando comparados com o controle.

Figura 22 – Avaliação da atividade metabólica de *Enterococcus faecalis* tratado com Clorexidina e sem Clorexidina por 5 min em polímero de PLA

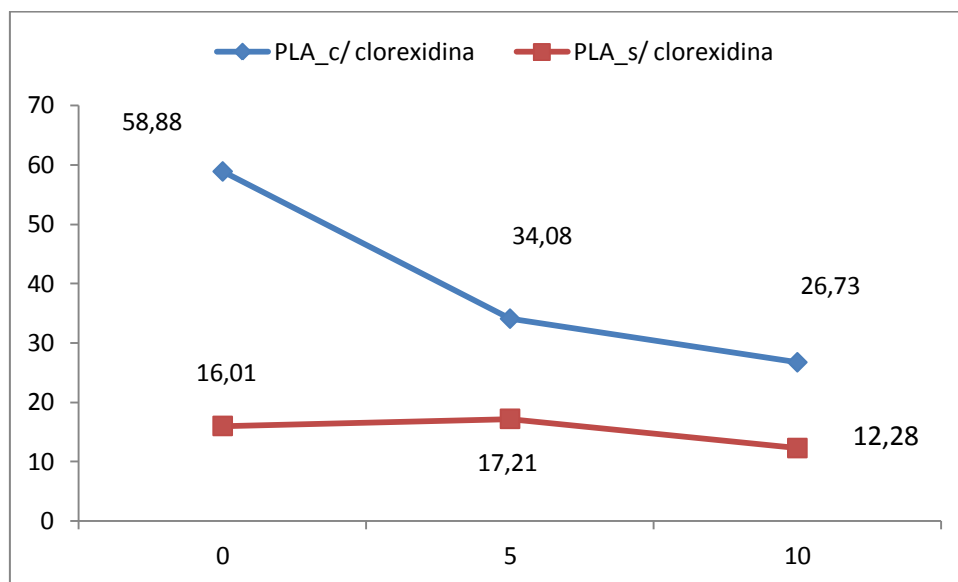


Legenda - (Controle/C) Controle com a Clorexidina; (PLA P/C) PLA P com a Clorexidina; (PLA 5/C) PLA 5% com a Clorexidina; (PLA 10/C) PLA 10% com a Clorexidina; (Controle/S) Controle sem a Clorexidina; (PLA P/S) PLA P sem a Clorexidina; (PLA 5/S) PLA 5% sem a Clorexidina; (PLA 10/S) PLA 10% sem a Clorexidina.

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (ANOVA, teste de Tukey, $p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Porcentual de redução do micro-organismo *Enterococcus faecalis* tratado com Clorexidina e sem Clorexidina em polímero de PLA pelo teste de MTT



Legenda – (0) PLA Poroso; (5) PLA 5%; (10) PLA 10%.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, com o envelhecimento da população mundial se faz necessário desenvolver novas tecnologias de fabricação de biomateriais, visando suprir a necessidade nas áreas de regeneração periodontal e periapical. Pesquisas evidenciam que tratamentos clínicos baseados na regeneração com membranas periodontais, onde a membrana é aplicada sobre o defeito do tecido periodontal, apresentam resultados favoráveis (Fujihara et al., 2005; Liao et al., 2005; Gentile et al., 2011; Bottino, Thomas, 2015).

Membranas biodegradáveis poliméricas são consideradas seguras no corpo, pois são eventualmente degradadas em dióxido de carbono e água, além de apresentar boa operabilidade para uso clínico. Logo, permitem que em uma única etapa todo o procedimento seja concluído, sem a necessidade de retornos. Bem como, reduz desconfortos e altos custos para o paciente (Yoshimoto et al., 2018). Além de eliminar possíveis complicações cirúrgicas devido a contaminações em virtude de uma recidiva cirurgia (Gentile et al., 2011).

Na literatura, é relatada a aplicação dos polímeros biorreabsorvíveis PLA e PCL, onde são usados como materiais simples e como matrizes compostas de polímero para produzir estruturas tridimensionais altamente porosas na regeneração óssea e assim permitem várias aplicações biomédicas e clínicas. Apresentam baixo custo e fácil processabilidade, sendo possível sua customização e adaptação ao local da cirurgia (Dziadek et al., 2015; Gandolfi et al., 2018; Diomedes et al., 2018).

Em nosso estudo, a incorporação de fibras de silicato de cálcio a membranas reabsorvíveis porosas está diretamente atribuída à propriedade de osteocondução a partir do silicato de cálcio, em virtude do silício estimular a proliferação de células ósseas (osteoblastos) e melhorar a osteogênese, além da

angiogênese. Por mesmas razões, os materiais com silicato de cálcio receberam maior atenção na endodontia, em defeitos ósseos periapicais. Estudos mostraram que os materiais com silicato de cálcio apresentam boa biocompatibilidade e bioatividade quando imersos em fluídos corporais, como também boa capacidade de selamento e preenchimento de raiz (Zhang et al., 2013; Taddei et al., 2009; Deng et al., 2017).

Por meio dos testes empregados no presente estudo, os resultados revelaram que os grupos experimentais são biocompatíveis *in vitro*, pois não apresentaram citotoxicidade como também não foram genotóxicos para a célula.

Em relação à viabilidade celular, nossos estudos revelaram presença de células viáveis em todos os grupos, sugerindo que íons de silicato de cálcio não têm efeito significativo sobre a proliferação celular. Concordando com os nossos resultados Shi et al. (2014) relataram em seu estudo que o aumento das concentrações de íons de Ca e Si não influencia a proliferação celular, bem como, a atividade da fosfatase alcalina em células MC3T3.

Para a avaliação de genotoxicidade das membranas poliméricas foi empregado o teste de micronúcleos, que consiste na visualização de um pequeno núcleo acoplado ao núcleo verdadeiro que aparece a partir do deslocamento de fragmentos de cromossomo do núcleo principal, estes micronúcleos surgem por alterações genéticas espontâneas ou são induzidos por agentes genotóxicos (Luzhna et al., 2013). Verificou-se que os grupos experimentais induziram a formação de números mais baixos ou iguais de micronúcleos em relação ao controle, como resultado os grupos experimentais não são genotóxicos. Similar aos nossos resultados, Uzun et al. (2015) também não observaram efeito genotóxico da membrana de PLA detectado na linhagem celular CHO-K1 pelo ensaio cometa e micronúcleo.

Neste estudo a avaliação dos indicadores da atividade celular e osteogênese foram realizadas a partir do conteúdo de proteína total, como também atividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização.

Na análise de conteúdo de proteína total, nossos resultados revelam que ambos os grupos experimentais que apresentam 5% de silicato de cálcio na composição, exibiram os melhores resultados, sugerindo que a adição do silicato à membrana polimérica exerce maior atividade de síntese celular, destacando o grupo PCL, porém sem diferença estatística ($p>0.05$).

Outro importante marcador para a diferenciação osteoblástica é a produção da enzima da fosfatase alcalina, a qual é decisiva para a mineralização da matriz extracelular e para a calcificação, que ocorre pelo acúmulo de íons de cálcio e fosfato inorgânico sobre a matriz produzida pela célula. Níveis elevados da fosfatase alcalina no tecido ósseo são observados durante a fase inicial da mineralização, ou seja, é caracterizado como um marcador precoce (Ravichandran et al., 2012; Cozza et al., 2018). Dziadek et al. (2014) avaliaram a atividade da fosfatase alcalina de osteoblasto em contato com materiais poliméricos de PCL, no período de 7 dias e concluíram que o efeito de partículas como íons de cálcio, silício e fosfato liberados pelos vidros bioativos presentes na matriz polimérica de PCL está relacionado com a intensificação da atividade da fosfatase alcalina. A partir do nosso estudo sugere-se que a incorporação de silicato de cálcio pode ter acelerado a fase de diferenciação celular, como também, a mineralização. Já que nos grupos experimentais aos 14 dias, observou-se que todos os grupos exibiram maior atividade de fosfatase que o grupo controle, porém sem diferença estatística ($p>0.05$). O grupo PLA P e PCL 5% exibiram maiores médias, mas não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Tayton et al. (2014) observaram que os *scaffold* de polímero de PLA e PLA associado com hidroxiapatita, apresentaram uma maior atividade osteoblástica na atividade da fosfatase alcalina.

Em um período de 21 dias, foi possível avaliar qualitativamente a formação de nódulos de mineralização em todos os grupos experimentais, indicando que as células MG-63 foram capazes de aderir, proliferar e formar nódulos mineralizados em membranas poliméricas. Da mesma forma que acredita-se que a alta atividade da fosfatase alcalina pode estar relacionada com a incorporação de silicato de cálcio e assim favorecer a diferenciação celular, sugere-se que este fato ocorra também com o processo de mineralização. A mineralização é a fase final da diferenciação de osteoblastos, onde a matriz mineral constituída por hidroxiapatita é secretada e depositada por osteoblastos maduros (Farea et al., 2014).

Assim como a biocompatibilidade, a aplicação de um biomaterial polimérico e biodegradável com propriedades antimicrobianas é altamente desejável particularmente na clínica odontológica. No presente estudo avaliou-se a influência das membranas reabsorvíveis porosas de polímeros PLA e PCL incorporadas com fibras de silicato de cálcio na redução de biofilmes monotípicos de *Enterococcus faecalis*, quando associados ou não a solução gluconato de clorexidina a 0,12%. O gluconato de clorexidina é um agente antibacteriano muito utilizado na odontologia. Apresenta ação antibacteriana a um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-Negativas, sendo em baixas concentrações bacteriostática e em altas concentrações bactericida. Por ser uma molécula catiônica, ela é atraída e adsorvida a superfície bacteriana, que está carregada negativamente (Lopes, Siqueira, 2015).

Na avaliação da atividade metabólica dos micro-organismos em biofilme, no estudo observou-se com relação ao material PCL, que quando eles foram tratados com o gluconato de clorexidina houve redução da atividade metabólica de *E. faecalis*, sendo que essas reduções são observadas em comparação aos grupos não tratados. Notou-se também que o grupo controle foi semelhante estatisticamente ($p < 0.05$) aos grupos experimentais que continham

as membranas. Embora os grupos com as membranas, PCL 5% e PCL 10% tenham apresentado uma maior aderência de micro-organismos que o grupo controle e PCL P, este aumento não foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$). No grupo que não recebeu a adição do gluconato de clorexidina, os grupos experimentais contendo as membranas exibiram uma ação efetiva. O grupo controle obteve maior atividade metabólica de micro-organismo do que os grupos com as membranas PCL P, PCL 5% e PCL 10%. Sendo que o PCL P e PCL 10% promoveram as maiores reduções da atividade metabólica do micro-organismo, exibindo diferenças estatisticamente significante ($p < 0.05$) comparado ao controle. Assim o micro-organismo se mostrou mais sensível à aplicação dos grupos experimentais, sugerindo que os grupos experimentais não atuam como agentes facilitadores para a colonização de micro-organismos.

Com relação ao material PLA, comparando os dados obtidos na avaliação da atividade metabólica de *E. faecalis*, observa-se também que todos os grupos experimentais que foram testados com o tratamento de gluconato de clorexidina, obtiveram reduções no teste de atividade metabólica em comparação aos grupos não tratados. Quando se avalia os grupos tratados com o gluconato de clorexidina, embora não apresente diferenças estatisticamente significantes ($p > 0.05$), os grupos com as membranas apresentaram maiores reduções no teste de atividade metabólica, uma vez que o grupo controle exibiu maior atividade metabólica de micro-organismo. Por fim nota-se que no grupo sem a adição de gluconato de clorexidina, os grupos com as membranas PLA P, PLA 5% e PLA 10%, permitiram da mesma forma que o material PCL a redução da atividade metabólica de *E. faecalis*, comparando com o controle, sendo os resultados estatisticamente significantes ($p < 0.05$) com relação aos grupos experimentais. Concluiu-se que os grupos com membranas PCL P, PCL 5% e PCL 10%, demonstram maior dano a atividade metabólica e estrutural do micro-organismo. No entanto, quando foi adicionado o tratamento com

gluconato de clorexidina, este age de acordo com as suas propriedades antibacterianas, uma vez que o grupo controle e os grupos com as membranas PCL P, PCL 5% e PCL 10% não diferiram estatisticamente.

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, foi possível concluir experimentalmente que as membranas reabsorvíveis porosas de poli (ácido láctico) (PLA) e policaprolactona (PCL) incorporadas com fibras cerâmicas de silicato de cálcio quando submetidas a ensaios *in vitro* por meio de cultura celular de osteoblastos MG-63 são biocompatíveis. Em razão do favorável resultado da viabilidade celular, como também, da ausência na detecção da genotoxicidade.

Da mesma forma, verificou-se que o biomaterial contribuiu com a osteogênese, demonstrando possibilidade de ser utilizado no tratamento de lesões periapicais. Além disso, apresentou resultados promissores quando foi avaliada sua influência na redução do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

REFERÊNCIAS*

Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J. Biomed Mater Res.* 2001 Mai;55(2):141-50. PubMed PMID: 11255165

Al-Ahmad A, Wiedmann-Al-Ahmad M, Carvalho C, Lang M, Follo M, Braun G, et al. Bacterial and *Candida albicans* adhesion on rapid prototyping-produced 3D-scaffolds manufactured as bone replacement materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2008 Jan 28;87A:933–43. doi:10.1002/jbm.a.31832

Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 2007 Mai;22(5):1304-9. doi: 10.1093/humrep/dem011. PubMed PMID: 17307808

Anderson HC, Sipe JB, Hessie L, Dharmamraju R, Atti E, Camacho NP, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol.* 2004 Mar;164(3):841–7. PubMed PMID 14982838

Andrei M, Dinischiotu A, Didilescu AC, Ionita D, Demetrescu I. Periodontal materials and cell biology for guided tissue and bone regeneration. *Ann Anat.* 2018 Mar; 216:164-9. doi: 10.1016/j.aanat.2017.11.007. PMID: 29289707

Barbanti SH, Santos AR Jr, Zavaglia CA, Duek EA. Degradação acelerada de suportes de poli(ε-Caprolactona) e poli(D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em meio alcalino. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2006;16(2):141-8. doi: 10.1007/s10856-011-4398-0. PubMed PMID: 21833608

Barber FA, Dockery WD, Cowden CH. The degradation outcome of biocomposite suture anchors made from poly L-lactide-co-glycolide and β-tricalcium phosphate. *Arthroscopy.* 2013;29(11):1834–9. doi: 10.1016/j.arthro.2013.08.004. PubMed PMID: 24209681

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Beachley V, Wen X. Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions. *Progress in Polymer Science*. 2010 Jul 1;35(7):868–92. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003. PubMed PMID: 20582161

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J*. 2005;16(2):156-61. doi: 10.1590/S0103-64402005000200013

Bostancioglu RB, Gurbuz M, Akyurekli AG, Dogan A, Koparal AS, Koparal AT. Adhesion profile and differentiation capacity of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells grown on metal ion (Zn, Ag and Cu) doped hydroxyapatite nano-coated surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Jul 1;155:415-28. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.015. PubMed PMID: 28460304

Bottino MC, Thomas V. Membranes for periodontal regeneration- a materials perspective. *Front Oral Biol*. 2015;17:90-100. doi:10.1159/000381699

Bugarin JG, Garrafa V. Bioética e biossegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. *Revista de Saúde Pública*. 2007; 41(2):223-8. doi: 10.1590/s0034-89102007000200008

Callister Jr WD. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. Trad. Sérgio Mutrilo Stamile Soares. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 705 p.

Callister Jr WD, Rethwisch DG. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. Trad. Sérgio Murilo Stamile Soares. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016.

Chai YC, Bolander J, Papantoniou I, Patterson J, Vleugels J, Schrooten J et al. Harnessing the osteogenicity of in vitro stem cell-derived mineralized extracellular matrix as 3d biotemplate to guide bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2017 Mar 24. doi: 10.1089/ten.tea.2016.0432. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 28338421

Cordas CM. Biomateriais: utilização e controle em meios fisiológicos. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. *Revista Proformar*. 2006; 13:11.

Cosme-Silva L, Carnevalli B, Sakai VT, Viola NV, Franco de Carvalho L, Franco de Carvalho EM. Radicular perforation repair with mineral trioxide aggregate: a case report with 10-year follow-up. *Open Dent J*. 2016 Dec

30;10:733-8. doi: 10.2174/1874210601610010733. eCollection 2016. PMID: 28217189

Cozza N, Monte F, Bonani W, Aswath P, Motta A, Migliaresi C. Bioactivity and mineralization of natural hydroxyapatite from cuttlefish bone and Bioglass® co-sintered bioceramics. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Feb;12(2):e1131-e1142. doi: 10.1002/term.2448

Dantas TS, Lelis ER, Naves LZ, Fernandes AJ, Magalhães D. Materiais de enxerto ósseo e suas aplicações na Odontologia. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2011;13(2):131-5.

Deng Y, Jiang C, Li C, Li T, Peng M, Wang J, et al. 3D printed scaffolds of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation. *Sci Rep*. 2017;7:5588. doi: 10.1038/s41598-017-05196-1. PMID: 28717129

Diomedea F, Gugliandolo A, Scionti D, Mérciario I, Cavalcanti MF, Mazzon E, et al. Biotherapeutic effect of gingival stem cells conditioned medium in bone tissue restoration. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 23;19(2). pii: E329. doi: 10.3390/ijms19020329. PMID:29360771

Dziadek M, Pawlik J, Menaszek E, Stodolak-Zych E, Cholewa-Kowalska K. Effect of the preparation methods on architecture, crystallinity, hydrolytic degradation, bioactivity, and biocompatibility of PCL/bioglass composite scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015 Nov;103(8):1580-93. doi: 10.1002/jbm.b.33350

Farea M, Husein A, Halim AS, Abdullah NA, Mokhtar KI, Lim CK, et al. Synergistic effects of chitosan scaffold and TGF β 1 on the proliferation and osteogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth. *Arch Oral Biol*. 2014 Dec;59(12):1400-11. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.08.015. PMID: 25222336

Fernandes JS, Gentile P, Pires RA, Reis RL, Hatton PV. Multifunctional bioactive glass and glass-ceramic biomaterials with antibacterial properties for repair and regeneration of bone tissue. *Acta Biomaterialia*. 2017 Jul; 59:2–11

Ferreira MM, Carrilho EVP, Leitão J. Mecanismo e classificação das reabsorções radiculares. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 2006;47(4):241-8.

Fujihara k, Kotaki M, Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers.

Biomaterials. 2005

Jul;26(19):41394147.doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.014.

Gandolfi MG, Zamparini F, Degli Esposti M, Chiellini F, Aparicio C, Fava F, et al. Polylactic acid-based porous scaffolds doped with calcium silicate and dicalcium phosphate dihydrate designed for biomedical application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Jan 1;(82):163-81.

doi:10.1016/j.msec.2017.08.040. PMID:29025644

Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr Opin Microbiol*. 2017 Dec 8;41:76-82. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.030. [Epub ahead of print] Review. PMID: 29227922

Garcia-Alvarez R, Izquierdo- Barba I, Vallet- Regi M. 3D scaffold with effective multidrug sequential release against bacteria biofilm. *Acta Biomater*. 2017 Feb;49:113-26. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.028

García-González CA, Barros J, Rey-Rico A, Redondo P, Gómez-Amoza JL, Concheiro A, et al. Antimicrobial properties and osteogenicity of vancomycin-loaded synthetic scaffolds obtained by supercritical foaming. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018 Jan 31;10(4):3349-60. doi: 10.1021/acsami.7b17375. PMID: 29313664

Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J*. 2011 Oct; 6(10):1187-97. doi:10.1002/biot.201100294

Guzman Prieto AM, Van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front Microbiol*. 2016 May 26;7:788. doi: 10.3389/fmicb.2016.00788. PMID:27303380

Handal T, Caugant DA, Olsen I, Sunde PT. Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth. *J Oral Microbiol*. 2009 May 21; 1: doi: 10.3402/jom.v1i0.1946. PMID: 21523213

Hayashi S, Sugai M, Nakagawa ZE, Takei T, Kawasaki K, Katsuyama T, et al. Preparation of CaSiO₃ whiskers from alkali halide Fluxes. *J Eur Ceram Soc*. 2000;20:1099-103. doi: 10.1016/S0955-2219(99)00248-4

Heidari H, Hasanpour S, Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M. High incidence of virulence factors among clinical *Enterococcus faecalis* isolates in southwestern Iran. Infect Chemother. 2017 Mar;49(1):51–6. doi: 10.3947/ic.2017.49.1.51. PMID: 28332345

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. Biomaterials. 2000 Dec;24(21):2529–43. PubMed PMID: 11071603

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 384 p. ISBN 978853525944-5

Karunakaram JV, Abraham CS, Karthik AK, Jayaprakash N. Successful nonsurgical management of periapical lesions of endodontic origin: a conservative orthograde approach. J Pharm Bioallied Sci. 2017 Nov; 9(Suppl 1):S246–S251. doi:10.4103/jpbs.JPBS_100_17

Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. Quím Nova. 2000;23(4):518-22. doi: 10.1590/S0100-40422000000400015

Kayaoglu G, Erten H, Alaçam T, Orstavik D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2005 Jun 7;38(7):483-88. doi:10.1111/j.1365-2591.2005.00981.x

Kenneth MH, Cohen S. Caminhos da polpa. Trad. Alcir Costa Fernandes Filho. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 928 p. ISBN 9788535239652

Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. J Endod. 2008 Dec;34(12):1515-20. doi:10.1016/j.joen.2008.08.035

Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. J Pharm Bioallied Sci. 2013 Jun;5(Suppl 1):S125–S127. doi: 10.4103/0975-7406.113312. PMID:23946565

Lacerda MFLS, Coutinho TM, Barrocas D, Rodrigues JT, Fábio V. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. Rev Bras Odontol. 2016 Jul/Set;73(3):212-7.

Liao S, Wang W, Uo M, Ohkawa S, Akasaka T, Tamura K, et al. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials*. 2005 Dec;26(36):7564-71. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.050

Lopes HP, Siqueira JF. *Endodontia: biologia e técnica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015. ISBN 9788535279672

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1951):265-75.

Luzhna L, Kathiria P, Kovalchuk O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Front Genet*. 2013;4:131. doi: 10.3389/fgene.2013.00131. PMCID: PMC3708156

Martins JV, Perussi MR, Rossi AC, Freire AR, Prado FB. Principais biomateriais utilizados em cirurgia de levantamento de seio maxilar: abordagem clínica. *Rev Odontol Araçatuba*. 2010 Jul/Dez;31(2):22-30.

Merolli A, Gabbi C, Cacchioli A, Ragionieri L, Caruso L, Giannotta L, et al. Bone response to polymers based on poly-lactic acid and having different degradation times. *J Mater Sci Mater Med*. 2001 Sep;12(9):775-8. PubMed PMID: 15348223

Moreno MSMS. *Engenharia de tecidos na substituição de tecido ósseo*. [Dissertação]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2014.

Motisuke M, Bertran CA. Síntese de "whiskers" de CaSiO₃ em fluxo salino para elaboração de biomateriais. *Cerâmica*. 2012;58:504-8. doi: 10.1590/S0366-69132012000400015

Nacer RS. *Estudo do comportamento do polímero de mamona como material de substituição óssea em defeito diafisário no fêmur de ratos frente a alterações secundárias à associação de nanopartículas de sílica e zircônia*. [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2009.

Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 2007;32(8-9):762–98. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

Oliveira FM, Carmona AM, Ladeira C. Is mobile phone radiation genotoxic an analysis of micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Mutat Res*. 2017 Oct;822:41-6. doi: 10.1016/j.mrgentox.2017.08.001. PMID: 28844241

Oréface RL. Materiais poliméricos - ciência e aplicações como biomateriais. In: Oréface RL, Pereira MM, Mansur HS. (Eds). *Biomateriais fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. p.87-155.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000 Sep;267(17):5421-6. PubMed PMID: 10951200

Pang JL, Wu BL, He WX, Zhang YQ, Zhao HP, Xie ZH. Effect of antisense oligonucleotide against mouse dentine matrix protein 1 on mineralization ability and calcium ions metabolism in odontoblast-like cell line MDPC-23. *Int Endod J*. 2006 Jul;39(7):527-37. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01104.x. PubMed PMID: 16776757

Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Análise microbiana do canal radicular e lesão perirradicular associada aos dentes com insuficiência endodôntica. *Anaerobe*. 2017 Dec; 48:12-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.016

Ravichandran R , Venugopal Jr. , Sundarrajan S , Mukherjee S, Ramakrishna S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomateriais*. 2012 Jan;33 (3):846-55. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2011.10.030. PMID: 22048006

Ródenas - Rochina J, Ribelles JL, Lebourg M. Estudo comparativo de suportes de PCL - HAp e PCL - vibroblast para engenharia de tecido ósseo. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24:1293–308. doi: 10.1007/s10856-013-4878-5

Santos Jr AR, Wada LMF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros*. 2007 Oct;17(4):308-17. doi: 10.1590/S0104-14282007000400010

Santos GG, Marinho SMOC, Miguel FB. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2010 Set/Dez;12(3):367-73. doi: 10.9771/cmbio.v12i3.8239

Scheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials*. 2015;8(6):2953-93; doi: 10.3390/ma8062953

Shi M, Zhai D, Zhao L, Wu C, Chang J. Nanosized mesoporous bioactive glass/poly(lactic-co-glycolic Acid) composite-coated CaSiO₃ scaffolds with multifunctional properties for bone tissue engineering. *Biomed Res Int*. 2014;2014:323046. Mar 2. doi: 10.1155/2014/323046. PMID: 24724080

Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2000 Jan/Jun;8(1/2):1-10.

Sladkova M, Palmer M, Öhman C, Cheng J, Al-Ansari S, Saad M, et al. Engineering human bone grafts with new macroporous calcium phosphate cement scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Jun 21. doi: 10.1002/term.2491. [Epub ahead of print]. PubMed PMID: 28635177.

Spolidorio DMP, Duque C. Microbiologia e imunologia geral e odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2013. v. 2. ISBN 9788536701929

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jan;85(1):86-93. doi:10.1016/S1079-2104(98)90404-8

Taddei P, Tinti A, Gandolfi MG, Rossi PL, Prati C. Ageing of calcium silicate cements for endodontic use in simulated body fluids: A micro-Raman study. *J Raman Spectrosc*. 2009 Dec;40(12):1858-66. doi: 10.1002/jrs.2333

Tayton E, Purcell M, Aarvold A, Smith JO, Briscoe A, Kanczler JM, et al. A comparison of polymer and polymer-hydroxyapatite composite tissue engineered scaffolds for use in bone regeneration. An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Aug;102(8):2613-24. doi: 10.1002/jbm.a.34926. Epub 2013 Sep 5. PMID:24038868

Uzun N, Martins TD, Teixeira GM, Cunha NL, Oliveira RB, Nassar EJ, et al. Poly(L-lactic acid) membranes: absence of genotoxic hazard and potential for drug delivery. *Toxicol Lett*. 2015 Jan 22;232(2):513-8. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.11.032. PMID: 25479058

Veeramachaneni C, Gayathri C, Kakani AK, Mohini R. Use of bovine colostrum in periapical defects following surgical endodontics: Two case reports. J Conserv Dent. 2017 Sep-Oct; 20(5):374-377. doi:10.4103/JCD.JCD_411_15. PMID: 29386790

Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, Tsiomis AC, Carvalho TB, Fontes EB, et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. Arq Bras Med Vet Zootec. 2006;58(2):175-83. doi: 10.1590/S0102-09352006000200005.

Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu Cailian, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. J Endod. 2012 Jul;38(7):954-9. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.004

Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, et al. Development of a root canal treatment model in the rat. Sci Rep. 2017 Jul;7:3315. doi: 10.1038/s41598-017-03628-6

Yoo A, Rossi- Fedele G, Kidd SP, Rogers AH, Zilm PS. Association between extracellular material and biofilm formation in response to sodium hypochlorite by clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2018 Feb;44(2):269-73. doi: 10.1016/j.joen.2017.08.025

Yoshimoto I, Sasaki JI, Tsuboi R, Yamaguchi S, Kitagawa H, Imazato S. Development of layered PLGA membranes for periodontal tissue regeneration. Dental Materials. 2018 Mar; 34(3):538-50. doi:10.1016/j.dental.2017.12.011

Zeeshan S, Zhang YL, Tamimi F, Barralet J. Effect of processing conditions of dicalcium phosphate cements on graft resorption and bone formation. Acta Biomaterialia. 2017 April;53:526-35. doi: 10.1016/j.actbio.2017.02.022.

Zhang J, Zhou H, Yang K, Yuan Y, Liu C. RhBMP-2-loaded calcium silicate/calcium phosphate cement scaffold with hierarchically porous structure for enhanced bone tissue regeneration. Biomaterials. 2013 Dec;34(37):9381-92. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.059

Zou B, Chen X, Zhi W, Liu Y, Cui W, Hu S, et al. Promoted healing of femoral defects with in situ grown fibrous composites of hydroxyapatite and poly (DL-lactide). J Biomed Mater Res A. 2012;100(6):1407-18. doi: 10.1002/jbm.a.34079. PubMed PMID: 22374826.